

COMPETENCIA Y ALELOPATÍA EN EL SISTEMA SOJA (*Glycine max* (L.) Merr.) - MALEZA (*Artemisia annua* L.)

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Claudia Mariela Morvillo

Ingeniera Agrónoma - UBA - 2004

Lugar de trabajo: Cátedra de Cultivos Industriales (FAUBA)



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Elba B. de la Fuente

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora (Universidad de Buenos Aires)

Consejera de Estudios

Alejandra Gil

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires)

Consejera de Estudios

M. Alejandra Martínez-Ghersa

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad CAECE, Buenos Aires)

Doctor of Philosophy (Oregon State University, USA)

JURADO DE TESIS

Directora de tesis

Elba B. de la Fuente

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Antonio M^a Verdú González

Licenciado en Cs. Biológicas (Universidad Autónoma de Barcelona)

Doctor en Cs. Biológicas (Universidad Autónoma de Barcelona)

JURADO

Diego Alejandro Sampietro

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Tucumán)

Doctor (Universidad Nacional de Tucumán)

JURADO

Carlos Leonardo Armando Céspedes Acuña

Profesor en Ciencias Naturales y Químicas (Pontificia Universidad Católica de Chile)

Doctor en Ciencias Químicas (Universidad de Concepción de Chile)

Fecha de defensa de la tesis: 25 de Septiembre de 2012

A Antonio
A mi familia y amigos

"Conócete a ti *mismo*": a esto se reduce toda la ciencia.
Sólo cuando el hombre haya llegado a obtener el conocimiento
de todas las cosas podrá conocerse a sí mismo, pues las cosas
no son más que las fronteras del hombre.
(Nietzsche, 1886)

“Solo aquellos que se arriesgan a ir más lejos, descubrirán hasta donde pueden llegar”.
(Anónimo)

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas intento agradecer a todos los que colaboraron y ayudaron de alguna manera directa o indirectamente en la realización de esta Tesis:

A Elba de la Fuente, mi directora de tesis, por brindarme las herramientas durante todo el camino para construir este estudio: conocimiento, entusiasmo, una visión clara y objetiva de análisis. Por sus sabios consejos, su apoyo, su confianza y por su valioso tiempo dedicado durante todos estos años.

De igual manera quiero agradecer a Alejandra Gil, un pilar importante en la conformación de esta tesis, por su gran capacidad para transmitir el conocimiento, por su ayuda, y por su entusiasmo y visión crítica de análisis frente a situaciones que, día a día, dieron lugar durante el desarrollo de este trabajo.

A Alejandra Ghera por su excelente desempeño en su función, por su tiempo, su motivación y dedicación, y por brindarme una visión más global de los sistemas. Por sus invalorable aportes en las discusiones de los trabajos.

A Claudio Ghera por su generosidad, su tiempo y por transmitirme una visión holística del funcionamiento de los agroecosistemas.

A Antonio por su paciencia, su apoyo incondicional, su lindo humor y por su comprensión de que la distancia es algo relativo. Y por sobre todas las cosas, por su amor y por ser fuente de inspiración en esta última etapa, la escritura.

A mi mamá Angela, por su paciencia y comprensión de todos estos años. Por transmitirme su motivación y sus ganas de afrontar cualquier adversidad en el camino. A mi papá Roberto, por sus enseñanzas, su confianza y su visión crítica frente a las situaciones del día a día. A mi abuela Dora, por su comprensión y su buen humor de todos los días. A mi Abuelo Antonio, mi tía Titi y Tía Delia, por las lindas experiencias de vida que lograron transmitirme.

A mis hermanos Edu y Pablo, por las manos que me prestaron en los experimentos y por su paciencia y los buenos momentos compartidos. A Sheila, Ana, Antonio, Anamari, Antonio, Rocio y Rafa, por el cariño de estos años.

A toda mi familia distribuida por Mendoza, San Rafael, Córdoba, Mar del Plata, Trenque Lauquen, Canadá, España, por el apoyo en todos estos años.

A mi tía Eva, por su colaboración en el mundo de la microbiología, por su comprensión, su calidad humana y buenos consejos brindados en todo momento. A mi prima Vero, por su ayuda en el procesamiento de las muestras y por su apoyo en todos estos años.

A mis queridos y viejos amigos Belén, Euge, Caro, Mercedes, Marina di Fillippo, Melina, Marina Tondi, Raúl, Nico, Fernando, y no tan viejos, Dieguito, Griselda, Luciana, Cony y Marianne, quienes con su amistad me motivaron al término de esta Tesis.

A mi amiga Belén, no solo por su humanidad y gran persona que es, sino también por haberme alentado en varias instancias de la tesis, y especialmente la de la escritura. Por hacerme ver las cosas de otra manera, que la tesis no es una instancia para aprender sólo en lo profesional sino también en varios aspectos. Uno fortalece la paciencia y perseverancia, aprende a manejar el tiempo. Gracias por el resumen: Paciencia es la suma de paz + ciencia.

A mi amiga Mercedes, por su ayuda en el análisis de un mundo que a simple vista no es tan fácil de ver, el microbiológico.

A Judith, Horacio, Khalid, Jose Carlos, Eva, Lucía, Marijose, Mónica, Yésica, Castor, Nazaret, Javi, Diego, Patricio, Juan Pablo, y toda la peña de Córdoba. Muchas gracias por su amistad y sus consejos en estos últimos años.

A mis compañeras de “piso” Luciana y Lucía, quienes con paciencia me escucharon y supieron aconsejarme en el transcurso final de esta tesis. A mis nuevos vecinos y amigos, Reme y César, por los buenos momentos compartidos.

A Paola, por su dedicación y gran ayuda durante los experimentos. Por su amistad durante todos esos años.

A Ariel por su gran ayuda en los experimentos y por los buenos momentos vividos.

A Nico por su ayuda en los experimentos, por sus consejos y por su buen humor y por los lindos momentos compartidos.

A todos mis queridos compañeros de la Cátedra de Cultivos Industriales de la facultad de Agronomía por el buen tiempo compartido durante todos estos años, y porque cada uno contribuyó a que pudiese llegar a este momento. Especialmente a Adriana Kantolic, por su apoyo, confianza y sus palabras alentadoras. A Roberto, por su tiempo y consejos en el proyecto de tesis. A Adriana Lenardis, por su ayuda en la estadística y en los análisis de los datos, en donde encontraron un orden en lo “multivariado”. A Pilar Vilariño, por su tiempo y entusiasmo dedicado en la discusión de los resultados y por los papers brindados.

A Mirta, por su buena predisposición para resolver cualquier trámite administrativo. A Flor, Liliana y a Nora.

A Luis, por su ayuda en el campo de Cultivos y por las altas “horas de radiación acumulada” que pasamos en el ensayo.

A mis compañeros vecinos de la Cátedra de Cerealicultura por el buen tiempo compartido. Especialmente a Emilio Satorre, por sus valiosos comentarios en la discusión de los resultados. A Gustavo Maddonni, por su buen humor y su tiempo invertido en la gestión del secado de muestras de los experimentos.

A Walter, Juan Carlos y Roberto Tornese del IFEVA por su enorme apoyo logístico durante los experimentos. A Adrián Otero, por las instalaciones eléctricas realizadas. A Agustín, Guille, Sofia, Paola, Griselda, Juan quienes me ayudaron con su esfuerzo, dedicación y entusiasmo en los experimentos. A Luisito, de Cereales por su ayuda en el experimento. A los chicos del “batán”, David, Hernán, y también a Guillermo y Joaquín por sus aportes en la logística de los experimentos.

A Santiago Poggio, por su calidad profesional y humana, y por brindarme su tiempo para resolver dudas.

A Patricia del Fueyo por su buena predisposición para responder a las consultas. Por su calidad humana.

A Claudia Ribaudó, por los análisis de microbiología, su tiempo y por su valiosa dedicación en los ensayos y la discusión de los resultados.

A Olga Correa, por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo. Y a Eliana por los análisis de laboratorio.

A Carlos Carloni, Laura y María Verónica de Hemerote, por sus innumerables búsquedas de los artículos solicitados y por la eficiencia de sus respuestas.

A Horacio Bogo, del INQUIMAE/DQIAyQF de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por su tiempo, conocimiento, entusiasmo y dedicación en los pasos iniciales hacia la técnica de desorción en el carbón activado.

A José Luis González-Andújar, por su apoyo, honestidad, buen humor, paciencia y por su calidad humana. Y a todo su grupo de investigación del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Eva, Lucía, Yésica, Castor, David, Elena por abrirme las puertas y permitirme trabajar en el laboratorio y también poder desarrollar los experimentos en el campo experimental. Por las enseñanzas brindadas sobre la estadística y la “modelización”.

A Eva Hernández, por la discusión de los resultados y por transmitirme de una forma clara los conocimientos de los sistemas biológicos y estadísticos.

A todo el equipo de investigación del laboratorio SCAI y especialmente a Fernando Lafont de la Universidad de Córdoba de España, quien me abrió las puertas de su laboratorio para emprender una nueva técnica y que gracias a su conocimiento, paciencia y buena predisposición se llevó a cabo.

A Manolo Armentero y Cristóbal Domínguez por la excelencia en su calidad humana y profesional y por toda la ayuda brindada en el campo experimental. A toda la gente del IFAPA, que colaboró en los experimentos.

A la Facultad de Agronomía, por permitirme estudiar no sólo como durante la carrera sino también como estudiante de posgrado. Por permitir ser miembro de esta casa de estudios como profesional y abrirme las puertas para poder desarrollarme como tal.

A las becas, Fundación YPF, FONCyT por brindarme financiación para realizar mi trabajo de tesis.

A la Fundación Carolina y el MAEC-AECID que gracias a los proyectos financiados pude vincularme con investigadores, Jose Luis González Andujar y Fernando Lafont, que dieron respuestas a varios interrogantes planteados.

Al grupo de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, especialmente a Kitty, Paola, y Arnaldo por toda la ayuda brindada en los análisis del aceite esencial.

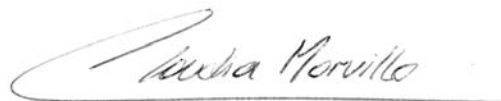
A Clarence Swanton, por su tiempo y dedicación y porque el producto de una conversación, logró darme paso a abordar el doctorado.

A todo el grupo de trabajo de la EPG, especialmente a Alicia Hirschhorn, Mabel Bressán, Susana, Amelia, Romina y María Laura.

Al jurado de mi tesis, Antonio M^a Verdú González, Diego Sampietro y Carlos Céspedes, quienes con sus comentarios, críticas y sugerencias mejoraron la versión final del manuscrito de esta tesis.

A todos Ustedes, muchas gracias. Quienes hicieron que el TODO, fuese más que la suma de sus partes!

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución”.

A handwritten signature in black ink, reading "Claudia Morvillo", written over a horizontal line.

Claudia Mariela Morvillo

INDICE GENERAL

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DECLARACIÓN.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xx
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1 INTRODUCCIÓN.....	2
1.1.1 Interacciones cultivo-malezas: competencia y alelopatía.....	2
1.1.2 Aleloquímicos: características, síntesis y liberación.....	4
1.1.3 Efectos directos e indirectos de la alelopatía.....	5
1.1.4 Impacto de la microflora del suelo sobre los aleloquímicos.....	6
1.1.5 Efecto del estrés biótico y abiótico sobre los aleloquímicos.....	8
1.1.5.1 Aleloquímicos y los efectos denso-dependientes.....	10
1.1.6 Aproximaciones experimentales al estudio de las interferencias.....	12
1.1.7 Escala de análisis de la competencia y la alelopatía.....	13
1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Hipótesis general.....	15
1.2.1.1 Hipótesis y predicciones específicas.....	15
1.2.3 Objetivo general.....	18
1.2.3.1 Objetivos específicos.....	18
1.3 METODOLOGÍA GENERAL.....	18
1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	19
CAPÍTULO 2: COMPETENCIA Y ALELOPATÍA EN EL SISTEMA SOJA-ALTAMISA	
2.1 INTRODUCCIÓN.....	22
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.2.1 Sitio experimental.....	23
2.2.2 Tratamientos y diseño experimental.....	24
2.2.3 Ensayos preliminares que definieron la metodología y los niveles de los tratamientos.....	26
2.2.4 Determinaciones.....	27
2.2.5 Análisis estadístico.....	27
2.3 RESULTADOS.....	28
2.3.1 Efecto del carbón activado en las monoculturas <i>D1</i> y <i>D5</i> a floración y a madurez de soja.....	28
2.3.2 Respuesta del cultivo a la interferencia de altamisa al estado de floración (R1).....	29
2.3.3 Respuesta del cultivo a la interferencia de altamisa a madurez (R8).....	33
2.4 DISCUSIÓN.....	42
2.5 CONCLUSIONES.....	45

CAPÍTULO 3: ALELOQUÍMICOS DE ALTAMISA Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE LA SOJA

3.1 INTRODUCCIÓN.....	48
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.2.1 Determinaciones de biomasa.....	50
3.2.2 Determinación del aceite esencial de la biomasa de altamisa.....	50
3.2.3 Determinación de la composición del aceite esencial.....	51
3.2.4 Análisis del aleloquímico artemisinina en el carbón activado.....	51
3.2.5 Análisis de los datos.....	53
3.3 RESULTADOS.....	55
3.3.1 Biomasa de H e I, producción y concentración de aceite esencial.....	55
3.3.2 Cambios relativos de la biomasa, producción y concentración de aceite esencial.....	60
3.3.3 Composición del aceite esencial.....	61
3.3.4 Producción de artemisinina en la biomasa aérea de H e I y su acumulación en el carbón activado.....	64
3.3.5 Relación de la artemisinina y su efecto sobre la soja.....	67
3.4 DISCUSIÓN.....	69
3.5 CONCLUSIONES.....	74

CAPÍTULO 4: FUENTES DE ARTEMISININA Y TIPOS DE SUELOS: EFECTO SOBRE LA NODULACIÓN Y EL RENDIMIENTO DE SOJA

4.1 INTRODUCCIÓN.....	76
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
4.2.1 Sitio experimental y diseño de los tratamientos.....	77
4.2.2 Determinaciones.....	79
4.2.3 Análisis estadístico.....	79
4.3 RESULTADOS.....	79
4.3.1 Nodulación y crecimiento radical de la soja.....	79
4.3.2 Biomasa de soja.....	82
4.3.3 Rendimiento de soja.....	84
4.3.4 Relación entre el número y la biomasa de nódulos y el rendimiento de soja.....	85
4.4 DISCUSIÓN.....	86
4.5 CONCLUSIONES.....	90

CAPÍTULO 5: EFECTOS DE LOS ALELOQUÍMICOS DE ALTAMISA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Bradyrhizobium japonicum*

5.1 INTRODUCCIÓN.....	92
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
5.2.1 Experimento Cualitativo.....	93
5.2.2 Experimento Cuantitativo	96
5.2.3 Determinaciones.....	96
5.3 RESULTADOS.....	96
5.3.1 Experimento Cualitativo.....	96
5.3.1 Experimento Cuantitativo.....	97
5.4 DISCUSIÓN.....	100
5.5 CONCLUSIONES.....	102

CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	
6.1 SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y CONTRASTE DE HIPÓTESIS	104
6.2 AVANCES LOGRADOS EN EL CONOCIMIENTO.....	109
6.3 IMPLICANCIAS AGRONÓMICAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	110
6.4 IMPLICANCIAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES.....	111
6.5 APLICACIONES FUTURAS.....	112
 BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	 113
ANEXO.....	128

INDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 1

Cuadro 1.1	Factores del ambiente abiótico y biótico y antrópicos causantes de estrés en las plantas (Adaptado de Reigosa <i>et al.</i> , 2002).....	8
-------------------	--	---

CAPÍTULO 2

Cuadro 2.1	Precipitaciones acumuladas (mm) y temperaturas máximas y mínimas (°C) registradas durante los meses del experimento en los años 2006 y 2007 por la Estación Meteorológica Villa Ortúzar.....	23
Cuadro 2.2	Biomasa de soja y altamisa, biomasa y número de nódulos, biomasa y número de raíces de soja para los factores de densidad (<i>D</i>), carbón activado (<i>C</i>) y herbicida (<i>H</i>) durante el 2006 y 2007. Valores medios a la floración del cultivo (R1, Fehr y Caviness, 1977).....	30
Cuadro 2.3	Valores de probabilidad resultantes del análisis de varianza de la biomasa de soja y altamisa en floración (R1), biomasa y número de nódulos, biomasa y número de raíces de soja para los factores de densidad (<i>D</i>), carbón activado (<i>C</i>) y herbicida (<i>H</i>) durante el 2006 y 2007.....	31
Cuadro 2.4	Biomasa aérea y rendimiento de soja y biomasa de altamisa según los factores de densidad (<i>D</i>), carbón activado (<i>C</i>) y herbicida (<i>H</i>) durante el 2006 y 2007. Valores medios en la madurez del cultivo (R8, Fehr y Caviness, 1977).....	34
Cuadro 2.5	Valores de probabilidad resultantes del análisis de varianza del rendimiento y biomasa de soja y biomasa de altamisa a la madurez de soja (R8) de los tratamientos de densidad (<i>D</i>), carbón activado (<i>C</i>) y herbicida (<i>H</i>) y sus interacciones en el 2006 y 2007.....	35
Cuadro 2.6	Parámetros obtenidos del modelo hiperbólico (Ecuación 2) que describe la relación entre el RR de soja y la BR de altamisa en madurez fisiológica (R8) del cultivo en los tratamientos con carbón y sin herbicida. Los valores entre paréntesis denotan el error estándar; p_{model} es la probabilidad del modelo y g.l. los grados de libertad.....	38
Cuadro 2.7	Valores medios, errores estándares y valores relativos del rendimiento de soja y biomasa de altamisa a madurez en los tratamientos de carbón y sin aplicación de herbicida para el año 2006 y 2007.....	40
Cuadro 2.8	Valores medios, errores estándares y valores relativos del rendimiento de soja y biomasa de altamisa a madurez en los tratamientos de carbón y con aplicación de herbicida para el año 2006 y 2007.....	41

CAPÍTULO 3

Cuadro 3.1	Valores de probabilidad resultantes del análisis de la varianza de la biomasa de H e I y aceite esencial de altamisa (%) y análisis de la covarianza de la esencia por superficie (ml m^{-2}) para los tratamientos de densidad (<i>D</i>) y herbicida (<i>H</i>) y sus interacciones en el 2006 y 2007.....	56
-------------------	---	----

Cuadro 3.2	Biomasa de H e I por superficie (g m^{-2}) y planta (g planta^{-1}) y concentración (%) y producción de aceite esencial (ml m^{-2}) según los factores de densidad (<i>D</i>) y herbicida (<i>H</i>) durante el 2006 y 2007.....	57
Cuadro 3.3	Coeficientes de correlación entre los datos de la composición de la esencia y las variables explicatorias de los dos ejes principales del ACC de los años 2006 y 2007.....	64
Cuadro 3.4	Valores medios de la artemisinina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) adsorbida en el carbón activado al momento de la madurez de soja (R8) proveniente de las parcelas C+ para los tratamientos de densidad (<i>D</i>) y herbicida (<i>H</i>) en los años 2006 y 2007. Entre paréntesis se indica el error estándar de la media.....	67
CAPÍTULO 4		
Cuadro 4.1	Temperaturas máximas y mínimas ($^{\circ}\text{C}$) y precipitaciones (mm) registradas durante los meses del experimento en el año 2008 por la Estación Meteorológica Villa Ortúzar.....	77
Cuadro 4.2	Cantidad de residuos aplicados y nivel de artemisinina en hoja (%) estimado según los tratamientos de la fuente de altamisa.....	78
Cuadro 4.3	Número y biomasa de nódulos de soja para el factor fuente de altamisa (<i>FA</i>), sustrato (<i>S</i>) y su interacción. Valores medios en el estado ontogénico de 4 hojas (V4) y floración (R1) de soja (Fehr y Caviness, 1977).....	80
Cuadro 4.4	Biomasa aérea total de soja para los factores de fuentes de altamisa (<i>FA</i>), Sustrato (<i>S</i>) y su interacción. Valores medios en el estado ontogénico de 4 hojas (V4), floración (R1) y madurez fisiológica (R8) de soja (Fehr y Caviness, 1977).....	83
CAPÍTULO 5		
Cuadro 5.1	Composición del medio Manitol-extracto levadura (Vincent, 1970).....	94
Cuadro 5.2	Tratamientos de artemisinina y aceite esencial evaluados.....	95
ANEXO		
Cuadro A.2.1	Determinaciones químicas del suelo correspondiente a un Argiudol vértico (de acuerdo a la taxonomía del USDA, 1999)..	128
Cuadro A.3.1 a	Valores medios \pm error estándar de los compuestos (%) del aceite esencial de <i>Artemisia annua</i> en el 2006.....	132
Cuadro A.3.1 b	Valores medios \pm error estándar de compuestos (%) del aceite esencial de <i>Artemisia annua</i> en el 2007.....	133
Cuadro A.3.2	Scores de los compuestos del aceite esencial de altamisa indicadores de los tratamientos. Fue considerada la composición de la esencia como matriz principal y las características de materia seca y producción y concentración de terpenos, y presencia de herbicida, como matriz secundaria.....	134
Cuadro A.3.3	Valores medios de artemisinina (% expresados sobre la base seca de 100 g de biomasa de hojas e inflorescencias).....	135
Cuadro A.4.1 a	Determinaciones químicas de los sustratos utilizados en el experimento (Valores promedio de tres muestras compuestas).....	136

Cuadro A.4.1 b	Contenido de arena, arcillo y limo y clasificación textural según los sustratos utilizados en el experimento.....	136
Cuadro A.5.1	Composición y proporción del aceite esencial (%) proveniente del tratamiento de la monocultura de altamisa, sin herbicida y sin carbón del experimento del año 2007.....	137

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1	Descripción esquemática de las fracciones disponibles y no disponibles de un aleloquímico producido y liberado por una planta en condiciones experimentales <i>in vitro</i> comparada con un experimento <i>in situ</i> , en el que se incluyen el suelo y la composición microbiana asociados al mismo. (Adaptado de Kaur <i>et al.</i> , 2009).....	7
Figura 1.2	Esquema teórico del aumento de la concentración de un aleloquímico en el tejido de una planta u órgano en función del incremento en el nivel de estrés, generado por factores bióticos y abióticos (1 a 7). (Adaptado de Einhelling, 1999).....	9
Figura 1.3	Esquema teórico de la respuesta en el crecimiento de una especie ante aumentos en la concentración de aleloquímicos. El umbral de inhibición variará en función del compuesto, especie y proceso involucrado y del estrés ambiental. (Adaptado de Einhelling, 1999).....	10
Figura 1.4	(a) Respuesta del rendimiento de soja por unidad de superficie a la densidad. (b) Relación entre el logaritmo de la biomasa media por planta y logaritmo de la densidad en el rango de densidades donde el rendimiento es constante. (c) Efecto de los aleloquímicos sobre el rendimiento y la densidad. Las curvas representan la desviación esperada con respecto a la relación representada en (b) ante bajas, moderadas y altas concentraciones de aleloquímicos en el suelo. (Adaptado de Weidenhamer <i>et al.</i> , 1989).....	11
Figura 1.5	Diseños experimentales utilizados más frecuentemente para el estudio de la competencia. Cada punto representa una combinación determinada de densidades cultivo-maleza. (a) Aditivo, (b) Sustitutivo, (c) Aditivo en series (d) Binario factorial completo. (Adaptado de Conolly <i>et al.</i> , 2001).....	12
Figura 1.6	Trabajos científicos publicados desde 1960 hasta 2010 en revistas con referato internacional relacionados con la competencia, alelopatía, competencia y alelopatía y alelopatía en condiciones de campo. (Información extraída de la base de datos Scopus 2011 considerando las palabras claves: “allelopathy”, “competition” y “field conditions” en el título y el texto).....	14
Figura 1.7 a	Representación esquemática de las predicciones de las hipótesis 1.....	16
Figura 1.7 b	Representación esquemática de las predicciones de las hipótesis 2.....	17
Figura 1.7 c	Representación esquemática de las predicciones de la hipótesis 3.....	17
Figura 1.7 d	Representación esquemática de las predicciones de la hipótesis 4.....	18
Figura 1.8	Diagrama de los experimentos realizados según su nivel de aproximación y desarrollo en los capítulos de la tesis.....	19
Figura 1.9	Diagrama esquemático de la estructura de la tesis.....	20

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1** Esquema representativo de la parcela principal *DI*, soja pura (a), de la sub-parcela (b) y de una planta de soja (c), mostrando las capas de carbón activado (5 mm) y de tierra proveniente del mismo campo experimental (5 mm), adicionada a la parcela del nivel *C+*, con carbón. Nótese que el carbón fue aplicado manualmente a modo de “lámina” sobre las capas superficiales del suelo, con el objeto de minimizar la interacción del carbón con las raíces de la soja y de altamisa..... 24
- Figura 2.2** Efecto de la densidad (*D*) y el carbón activado (con carbón, símbolos llenos y sin carbón símbolos vacíos) sobre el número de raíces (raíces m^{-3}) en 2007. *D*, (soja/altamisa, plantas m^{-2}); *D1*, 40/0 plantas m^{-2} ; *D2*, 40/2 plantas m^{-2} ; *D3*, 40/4 plantas m^{-2} ; *D4*, 40/8 plantas m^{-2} . Las líneas verticales representan el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias con y sin carbón según el Test de Tukey a un nivel de $p < 0,05$ 32
- Figura 2.3** Relación entre la biomasa de nódulos (g m^{-3}) y el número de nódulos (N m^{-3}) El modelo potencial (Ecuación 1, $\hat{Y}_{ijk} = d X_{ij}^f$) fue el que se ajustó para cada tratamiento de carbón (*C-*, *C+*) y herbicida (*H-*, *H+*)..... 32
- Figura 2.4** Efecto del carbón activado (sin carbón, barras blancas y con carbón, barras negras) sobre el biomasa específica de nódulos (mg unidad^{-1}) en 2006 y 2007. Las barras representan las medias y las líneas verticales el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas dentro de cada año, de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$ 33
- Figura 2.5** Efecto de la densidad (*D*), el herbicida (sin y con aplicación) y el carbón activado (sin, barras blancas y con, barras negras) sobre el rendimiento de soja (g m^{-2}) en el 2006. Las líneas verticales representan los desvíos estándares. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$. F-test significativo al nivel de $p < 0,05$ 36
- Figura 2.6** Efecto de la densidad (*D*) y el herbicida (sin y con aplicación) sobre la biomasa de altamisa (g m^{-2}) a R8 del cultivo (madurez fisiológica, Fehr y Cavinnes, 1977). *D*, (soja/altamisa, plantas m^{-2}); *D1*, 40/0 plantas m^{-2} ; *D2*, 40/2 plantas m^{-2} ; *D3*, 40/4 plantas m^{-2} ; *D4*, 40/8 plantas m^{-2} y *D5*, 0/8 plantas m^{-2} . Los símbolos representan las medias y las líneas verticales el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$. F-test significativo al nivel de $p < 0,05$. *Indica diferencias no significativas para un mismo nivel de densidad pero diferente nivel de herbicida..... 37
- Figura 2.7** Rendimiento relativo de soja ($\text{RR, g m}^{-2}/\text{gm}^{-2}$) en función de la biomasa relativa de altamisa ($\text{BR, g m}^{-2}/\text{gm}^{-2}$) en R8 del cultivo, sin (símbolos vacíos) y con (símbolos llenos) carbón activado, sin aplicación de herbicida (a) y con aplicación (b) durante el 2006 y 2007. Los símbolos representan las medias de los tratamientos y las líneas verticales el error estándar de la media. En (a), la línea representa el modelo hiperbólico (Ec. 1). Rendimiento relativo de soja=1 representa el rendimiento en la parcela control de soja (*DI*):

	306 y 317 g m ⁻² en los tratamientos sin y con carbón en 2006 y 228 y 237 g m ⁻² en 2007, respectivamente. La biomasa relativa de altamisa =1 representa la biomasa en las parcelas control de altamisa (D5): 746 y 779 g m ⁻² en el tratamiento C- y C+, respectivamente en el 2006 y 525 y 544 g m ⁻² para el 2007.....	38
CAPÍTULO 3		
Figura 3.1	Estructura molecular de la artemisinina (sesquiterpeno lactona, no volátil) y de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de altamisa: 1,8 cineol, alcanfor, artemisia cetona y germacreno D.....	48
Figura 3.2	Interpretación de los cambios en la concentración relativa y el contenido relativo de aleloquímicos y el peso relativo del órgano (i.e. hoja o planta), (Adaptado de Koricheva, 1999 y Veteli et al., 2007). La línea punteada oblicua representan los valores de la biomasa relativa=1, las líneas punteadas perpendiculares esquematizan el contenido relativo de esencia=1 (vertical) y la concentración relativa de esencia=1 (horizontal). El círculo central representa el punto de referencia (Control: 1, 1, 1).....	54
Figura 3.3	Biomasa de H e I de altamisa por superficie (g m ⁻²) (a y b) y por planta (g planta ⁻¹) (c y d) según los tratamientos de densidad (D2, D3 y D4; 2,4 y 8 plantas de altamisa m ⁻² y D5, monocultura de altamisa) y herbicida (H- y H+, sin y con aplicación de glifosato) en el 2006 (a y c) y 2007 (b y d). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, con un nivel de significancia de p<0,05 según Test de Tukey.....	58
Figura 3.4	Concentración de aceite esencial de H e I (% , ml de aceite esencial/ 100 g biomasa de Hj + Inf) según los tratamientos de densidad y herbicida en el año 2006. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, con un nivel de significancia de p<0,05 según Test de Tukey.....	59
Figura 3.5	Aceite esencial de H e I de altamisa por superficie (ml m ⁻²) según los tratamientos de densidad y herbicida en el año 2006 (a) y 2007 (b). Las barras indican la media y las líneas verticales el error estándar de la media.....	60
Figura 3.6	Cambios vectoriales en el contenido relativo (ml/ml) y en la concentración relativa (%/%, expresado sobre base seca) del aceite esencial de altamisa en relación a los tratamientos de herbicida: sin aplicación de glifosato (H-, símbolos vacíos) y con aplicación (H+, símbolos llenos) y los niveles de densidad: D2 (círculos), D3 (triángulos) y D4 (cuadrados), (2, 4 y 8 plantas de altamisa m ⁻² , respectivamente), en los años 2006 (a) y 2007 (b).....	61
Figura 3.7	Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento de correspondencia canónica, considerando los compuestos como matriz principal y la biomasa aérea total de altamisa, la producción (ml) y concentración (%) de aceite esencial y la presencia o ausencia de herbicida como matriz secundaria para el año 2006 y 2007. Los vectores o biplots indican las variables explicatorias.....	63
Figura 3.8	Relación entre la artemisinina adsorbida en el carbón activado (µg m ⁻²) y la acumulada en H e I (µg m ⁻²) (a), la artemisinina de H e I (g m ⁻²)	

	y la biomasa de H e I (g m^{-2}) (b) y la concentración de artemisinina (%) de H e I en respuesta a la biomasa de altamisa de H e I (g m^{-2}) (c). Contenido de artemisinina ($\mu\text{g kg de carbón}^{-1}$) adsorbido en el carbón de las parcelas C+ (barras) y biomasa de H e I de altamisa (g m^{-2}) al momento de madurez de soja (R8) (círculos) según el tratamiento de densidad y año. Las letras indican diferencias significativas de artemisinina en los tratamientos de densidad para cada año, de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$	65
Figura 3.9		
Figura 3.10	Peso específico de nódulos ($\text{g unidad nódulo}^{-1}$) y rendimiento en grano de soja en función de los niveles de densidad (<i>D1</i> , <i>D2</i> , <i>D3</i> y <i>D4</i>) y artemisinina en el suelo ($\mu\text{g kg}^{-1}$ de carbón) para el tratamiento C-, sin carbón (barras blancas) y C+, con carbón (barras negras), con y sin herbicida en el año 2006 y 2007. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$	66
		68
CAPÍTULO 4		
Figura 4.1	Número y biomasa de nódulos según las fuentes de altamisa y el tipo de sustrato en los estados ontogénicos V4 y R1 de soja. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.....	81
Figura 4.2	Biomasa específica de nódulos (mg nódulo^{-1}) según la fuente de altamisa y el sustrato para los estados ontogénicos V4 y R1 de soja. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.....	81
Figura 4.3	Biomasa radical de soja (g planta^{-1}) según las distintas fuentes de altamisa (C, control; BS, biomasa seca, BV, biomasa viva, y A, artemisinina pura) y suelos en V4 y R1 de soja. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$. Las interacciones <i>FA</i> x <i>S</i> no fueron significativas para la biomasa radical de soja en V4 ($p = 0,08$) y R1 ($p = 0,72$).....	82
Figura 4.4	Biomasa aérea de soja según la fuente de altamisa y el sustrato en el estado ontogénico de 4 hojas (V4), floración (R1) y madurez fisiológica (R8) de soja (Fehr y Caviness, 1977). El tratamiento A no se evaluó en floración. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. El test de Tukey para la biomasa de soja en R1, no fue significativo al nivel de significancia $p < 0,05$	84
Figura 4.5	Rendimiento de soja (g maceta^{-1}) según la fuente de altamisa y sustrato a madurez fisiológica (R8, Fehr y Caviness, 1977). Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$	85
Figura 4.6	Relación entre el rendimiento en grano y la biomasa (a) y número (b) de nódulos por planta de soja. La biomasa y número de nódulos corresponde al estado ontogénico de R1 (floración, Fehr y Caviness, 1977). Las líneas verticales representan el error estándar de la media...	85
CAPITULO 5		
Figura 5.1	Fotografía explicativa del experimento cualitativo. Observación del crecimiento de <i>B. japonicum</i> a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos Control (C) y de artemisinina A1, A2 y A3 (2, 4 y 80 $\mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente). A los fines ilustrativos se muestra una sola	

	repetición de las tres evaluadas. Las fotografías se tomaron en el centro de cada placa a la misma distancia focal en todos los tratamientos. En el Anexo 5.2 se muestra la foto de todas las repeticiones.....	97
Figura 5.2	Fotografía explicativa del experimento cualitativo. Observación del crecimiento de <i>B. japonicum</i> a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos control (C), de esencia <i>E1</i> y <i>E2</i> (1,6 y 3,46 $\mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente), y la interacción de artemisinina y esencia <i>A2xE1</i> (4 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de artemisinina x 1,6 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de esencia). A los fines ilustrativos se muestra una sola repetición de las tres evaluadas. En el Anexo 5.3 se muestra la foto de todas las repeticiones.....	97
Figura 5.3	Unidades formadoras de colonia (UFC ml^{-1}) de <i>Bradhyrizobium japonicum</i> a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos de control (C), dosis crecientes de artemisinina (<i>A1</i> , <i>A2</i> y <i>A3</i> , 2, 4 y 80 $\mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente), esencia de altamisa (<i>E1</i> , 1,6 $\mu\text{l ml}^{-1}$) y su interacción (<i>A2 x E1</i> , 4 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de artemisinina x 1,6 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de esencia). El error estándar de la media de los tratamientos C, <i>A1</i> , <i>A2</i> y <i>E1</i> fue nulo dado las UFC no variaron en las tres repeticiones.....	98
Figura 5.4	Esquema de imágenes de colonias de <i>Bradhyrizobium japonicum</i> de los tratamientos de Artemisinina (<i>A1</i> , 2 $\mu\text{l ml}^{-1}$; <i>A2</i> , 4 $\mu\text{l ml}^{-1}$ y <i>A3</i> , 80 $\mu\text{l ml}^{-1}$), Esencia (<i>E1</i> , 1,6 $\mu\text{l ml}^{-1}$) y su interacción (4 $\mu\text{l ml}^{-1}$ x 1,66 $\mu\text{l ml}^{-1}$) y control (C). Las imágenes se tomaron a las 216 h posteriores a la siembra y aplicación de los tratamientos, con Lupa Leica (MZ6) a una misma distancia focal, con aumento 6,3x. La falta de nitidez de algunas fotos, puede deberse a que las mismas se fotografiaron a través de la tapa de la caja de Petri.....	99
CAPÍTULO 6		
Figura 6.1	Modelo conceptual de las principales componentes del agroecosistema (soja, altamisa y microorganismos del suelo) y algunas de sus principales interacciones (competencia, alelopatía y mutualismo) cuantificadas a través de las principales variables respuesta (biomasa, rendimiento, aleloquímicos). V: Volatilización, L: Lixiviación, DG: Degradabilidad; As: Afinidad por el suelo, T: Transformación por los microorganismos del suelo.....	105
ANEXO		
Figura A.2.1	Valor del índice de clorofila en hoja (SPAD) según los niveles de densidad <i>D</i> , (soja/altamisa, plantas m^{-2}); <i>D1</i> , 40/0 plantas m^{-2} ; <i>D2</i> , 40/2 plantas m^{-2} ; <i>D3</i> , 40/4 plantas m^{-2} ; <i>D4</i> , 40/8 plantas m^{-2} , y <i>D5</i> , 0/8 plantas m^{-2} , en la etapa vegetativa V5 de soja (Fehr y Caviness, 1977).....	129
Figura A.2.2	Efecto del carbón activado en las parcelas <i>D1</i> y <i>D5</i> a floración de soja (R1, Fehr y Caviness, 1977) sobre: (a) biomasa de soja (g m^{-2}), (b) biomasa de altamisa (g m^{-2}), (c) biomasa de nódulos (g m^{-3}), (d) número de nódulos (nódulos m^{-3}), (e) biomasa de raíces de soja (g m^{-3}), y (f) número de raíces de soja (raíces m^{-3}) en las parcelas control durante el 2006 y 2007. Las parcelas control fueron soja pura (<i>D1</i>) o altamisa pura (<i>D5</i>) sin carbón y sin herbicida (barras blancas) y con carbón y sin herbicida (barras negras), respectivamente. Las medias de biomasa de altamisa, número y biomasa de nódulos fueron re-transformadas (aplicando anti-logaritmo). Las líneas verticales	

	denotan el error estándar de la media. ns, no significativo al nivel $p < 0,05$ del F-test.....	130
Figura A.2.3	Efecto del carbón activado en las parcelas <i>D1</i> y <i>D5</i> a madurez de soja (R8, Ferh y Caviness, 1977) sobre: la biomasa de soja y altamisa (g m^{-2}) y el rendimiento de soja (g m^{-2}) en las parcelas control durante el año 2006 y 2007. Las parcelas control fueron soja pura (<i>D1</i>) o altamisa pura (<i>D5</i>) sin carbón y sin herbicida (barras blancas) y con carbón y sin herbicida (barras negras), respectivamente. Las medias de biomasa de altamisa fueron re-transformadas. Las líneas verticales denotan el error estándar de la media. ns, no significativo al nivel $p < 0,05$ del F-test.....	131
Figura A.3.4	Evolución del PAR incidente (Mj m^{-2}) desde el día del transplante de altamisa en las parcelas experimentales de los años 2006 y 2007. Se presentan la duración de la estación de crecimiento de altamisa para ambos experimentos. Las flechas indican momento de cosecha.....	135
Figura A.5.1	Fotografía explicativa del experimento cualitativo. Observación del crecimiento de <i>B. japonicum</i> a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos control (<i>C</i>) y de artemisinina <i>A1</i> , <i>A2</i> y <i>A3</i> (2, 4 y $80 \mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente).....	138
Figura A.5.2	Fotografía explicativa del experimento cualitativo. Observación del crecimiento de <i>B. japonicum</i> a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos control (<i>C</i>), de esencia <i>E1</i> y <i>E2</i> ($1,6$ y $3,46 \mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente), y la interacción de artemisinina y esencia <i>A2xE1</i> ($4 \mu\text{l ml}^{-1}$ de artemisinina x $1,6 \mu\text{l ml}^{-1}$ de esencia).....	138

ABREVIATURAS

GM	Grupo de Madurez
D	Tratamiento de densidad
D1	Nivel de densidad: Monocultura soja, 40 plantas de soja m ⁻²
D2	Nivel de densidad: 40 plantas de soja m ⁻² + 2 plantas de altamisa m ⁻²
D3	Nivel de densidad: 40 plantas de soja m ⁻² + 4 plantas de altamisa m ⁻²
D4	Nivel de densidad: 40 plantas de soja m ⁻² + 8 plantas de altamisa m ⁻²
D5	Nivel de densidad : Monocultura altamisa, 8 plantas de altamisa m ⁻²
C	Tratamiento de carbón
C-	Nivel de carbón: sin aplicación de carbón activado
C+	Nivel de carbón: con aplicación de carbón activado
H	Tratamiento de herbicida
H-	Sin aplicación de herbicida
H+	Con aplicación de herbicida
P₁₀₀₀	Peso de mil semillas
RR	Rendimiento relativo
BR	Biomasa relativa
FBN	Fijación biológica del nitrógeno
FA	Fuentes de altamisa
S	Sustrato
UFC	Unidades formadoras de colonias
A	Artemisinina pura
E	Aceite esencial
H+I	Hojas e inflorescencias

RESUMEN

La maleza altamisa (*Artemisia annua* L.) interfiere con el cultivo de soja por competencia y alelopatía, moduladas por estreses bióticos y abióticos (e.g. densidad, herbicida). Los aleloquímicos de altamisa (e.g. artemisinina, aceite esencial) pueden afectar directamente el crecimiento del cultivo o, indirectamente, a través de *Bradyrhizobium japonicum* (bacteria fijadora de N). Comprender los efectos de las interacciones en el sistema soja-altamisa es agroecológicamente relevante para diseñar prácticas que optimicen la producción y minimicen el uso de insumos. El objetivo de esta tesis fue analizar las interferencias competitivas y alelopáticas entre soja-altamisa y su impacto sobre la nodulación y el rendimiento del cultivo ante cambios en la densidad de plantas y dosis de herbicida. La metodología incluyó ensayos en: (i) parcelas a campo con distintas combinaciones de densidades cultivo-maleza y niveles de alelopatía y de herbicida, (ii) macetas a campo con distintas fuentes de aleloquímicos (biomasa seca y verde de altamisa, artemisinina pura) y suelos (arcilloso y arenoso) y (iii) laboratorio con distintos tipos y niveles de aleloquímicos. (i) Altas densidades de altamisa junto con altos niveles de aleloquímicos en el suelo no redujeron el crecimiento y rendimiento de soja y promovieron la nodulación con o sin aplicación de dosis subletales de herbicida. (ii) El rendimiento fue mayor en presencia de aleloquímicos y sustrato arcilloso. La relación entre el rendimiento y el peso de los nódulos fue positiva y los mayores valores se registraron con biomasa seca de altamisa. (iii) La artemisinina y el aceite esencial provocaron un efecto sinérgico negativo sobre el crecimiento de *B. japonicum*. El efecto neto de las interacciones competitivas, alelopáticas y de mutualismo generadas entre soja y altamisa dependen no solo del ambiente explorado sino del nivel de organización estudiado. En condiciones de campo (parcelas y macetas), la interacción alelopática fue positiva o neutra, mientras que en laboratorio resultó negativa.

Palabras claves: aleloquímicos, altamisa, nodulación, rendimiento, *Bradyrhizobium japonicum*.

ABSTRACT

Annual wormwood (*Artemisia annua* L.) interferes with soybean crop by competition and allelopathy, which are modulated by biotic and abiotic stresses (e.g. density, herbicide). Allelochemicals released by annual wormwood (e.g. artemisinin, essential oils) may affect the crop directly or indirectly through their effect on *Bradyrhizobium japonicum* (nitrogen fixing symbiont). Understanding the effects of interactions in the soybean-annual wormwood system is agroecologically relevant to design practices that optimize production and minimize the use of inputs. The objective of this thesis was to analyze the competitive and allelopathic interferences between soybean crop and annual wormwood and their impact on nodulation and soybean yield in the presence of changes in plant density and herbicide dose. The methodology included tests using: (i) field plots with different crop-weed densities and levels of allelopathy and herbicide, (ii) pots under field conditions with different sources of allelochemicals (fresh and dry biomass, pure artemisinin) and soils (clay and sand) and (iii) in laboratory conditions with different types and levels of allelochemicals. (i) High densities of annual wormwood with high levels of allelochemicals in the soil maintained the growth and soybean yield and promoted the nodulation with and without the application of sublethal doses of herbicide. The relationship between soybean crop and nodules weight was positive and the highest values were recorded with dry biomass of annual wormwood. (iii) Artemisinin and essential oils had a negative synergistic effect on the growth of *B. japonicum*. The net effect of competitive, allelopathic and mutualistic interactions between soybean and annual wormwood depends not only on the environment but also on the level of organization studied. Under field conditions (plots and pots), the allelopathic effect on soybean crop was in general neutral or positive, while under laboratory conditions it was negative.

Keywords: allelochemicals, annual wormwood, nodulation, yield, *Bradyrhizobium japonicum*.

CAPÍTULO 1

Introducción General

1.1 INTRODUCCIÓN

Los cultivos y los organismos que los acompañan se relacionan de manera diversa, generando distintos tipos de interacciones, entre los individuos de una misma especie y entre los de especies distintas (Arthur y Mitchell, 1989; Swift y Anderson, 1993). Estas interacciones provocan interferencias que dan lugar a variaciones de la tasa de crecimiento o desarrollo individual, frecuentemente mediadas por los cambios generados por la presencia de otro individuo (Radosevich *et al.*, 2007).

En este sentido, los cultivos¹ y las malezas interactúan a través de mecanismos de interferencia como la competencia y la alelopatía que operan simultánea o secuencialmente (Inderjit y Del Moral, 1997). La mayor parte de los estudios están orientados a describir las consecuencias directas de la presencia de las malezas evaluando, por ejemplo, las pérdidas de rendimiento asociadas al incremento de la densidad o la biomasa de las malezas. En general, se asume que estas pérdidas son generadas principalmente como consecuencia directa de la competencia por la explotación de los recursos, ignorando los efectos debidos a otros tipos de interacciones negativas como la alelopatía ó los que pueden resultar de la acción conjunta de las interacciones negativas con otras positivas, como el mutualismo. Comprender los efectos múltiples de distintos tipos de interacciones en el sistema cultivo-maleza, es crítico para implementar estrategias de manejo y diseñar prácticas culturales basadas en el conocimiento de los niveles de infestación de las malezas que optimicen la producción y minimicen los costos (Radosevich *et al.*, 2007). Por lo tanto, el diseño de experimentos a fin de considerar las interacciones sinérgicas (o antagónicas) tanto en condiciones controladas como a campo traerá importantes avances a nivel teórico y empírico para la ecología y el manejo de los agroecosistemas productivos.

En los apartados siguientes se presenta un breve resumen del estado actual del conocimiento acerca de las interacciones competitivas y alelopáticas entre el cultivo y las malezas, la síntesis y liberación de aleloquímicos, los efectos directos e indirectos de la alelopatía, la relación entre la microflora del suelo y los aleloquímicos, el efecto del estrés sobre la síntesis y liberación de aleloquímicos, las aproximaciones experimentales al estudio del sistema cultivo-maleza y la escala de análisis de la competencia y la alelopatía. Todos estos temas generan el marco en el que se inscriben las hipótesis y los objetivos de esta tesis.

1.1.1 Interacciones cultivo-malezas: competencia y alelopatía

En sentido general, el término interferencia es utilizado para describir las interacciones que se establecen entre diferentes especies, poblaciones o individuos (Radosevich *et al.*, 2007). Las plantas son capaces de detectar organismos vecinos e interactuar con ellos por múltiples vías, por ejemplo, a través del uso de los recursos, del intercambio de diversos tipos de señales, como ser las interacciones mediadas por compuestos químicos (Callaway, 2002). Goldberg (1990) propuso que las interacciones entre plantas ocurren a través de algún intermediario (*i.e.* recurso, sustancia química, polinizador, microorganismo o herbívoro). Dichas interacciones pueden darse básicamente a través de dos procesos diferentes: (i) una o ambas plantas tienen un *efecto* sobre la abundancia del intermediario y (ii) una *respuesta* ante cambios en la

¹ El término cultivo hace referencia al conjunto de individuos de una misma especie que coexisten en el mismo espacio y tiempo.

abundancia de ese intermediario. El tipo de interacción dependerá de la identidad del intermediario y de la dirección (*i.e.* negativa o positiva) del efecto y la respuesta.

En los agroecosistemas las malezas pueden tener un efecto negativo, positivo o neutro (Holzapfel y Mahall, 1999) sobre el cultivo, que opera de manera simultánea y bidireccional. El impacto negativo que generan las malezas, puede percibirse a escala de cultivo o a escala de agroecosistema. Si bien los efectos a escala de cultivo pueden cuantificarse, por ejemplo, a través de la evaluación de la disminución del rendimiento o el incremento de los costos de control; los costos a escala de agroecosistema son de difícil cuantificación (Costanza, 1980).

Los efectos negativos de las malezas pueden clasificarse en varias categorías según el daño que ocasionan y el organismo afectado (Zimdahl, 2007): (*i*) competencia con el cultivo, (*ii*) incremento en los costos de protección, (*iii*) reducción de la calidad del producto cosechado, (*iv*) reducción de la calidad de la producción animal, (*v*) incremento en los costos de producción y procesamiento, (*vi*) dificultades en el manejo del agua en los canales de riego, (*vii*) reducción del valor de la tierra (*viii*) reducción en las opciones de elección de los cultivos en un lote en particular y (*ix*) valor estético. Los efectos negativos más importantes y documentados son aquellos que involucran las tres primeras categorías. Sin embargo, los efectos de las demás categorías pueden verse reflejados a través del incremento en los costos de producción y del manejo. Numerosas investigaciones cuantifican el impacto negativo, directo y económico de las malezas en los agroecosistemas (Pimentel *et al.*, 2000), estimándose como la proporción del rendimiento que se pierde o como los costos (*i.e.* herbicidas, combustible para las aplicaciones de agroquímicos) que insume el manejo. Los costos indirectos (*e.g.* generación de alergias en el hombre o toxicidad en los animales) de las malezas y los efectos no económicos (*e.g.* fuente de polen) son más difíciles de cuantificar (Sinden *et al.*, 2005).

Por otro lado, las malezas, como productores primarios (plantas) pueden ser utilizadas directamente como alimento de los consumidores de primer orden (herbívoros) e indirectamente, como refugio o fuente alternativa de alimento de los de segundo orden (carnívoros benéficos) (Bernays y Chapman, 1994; Norris y Kogan, 2005). Dichos efectos positivos son menos entendidos y más difíciles de evaluar que los negativos (Booth *et al.*, 2003).

De esta manera, la evaluación del impacto económico de las malezas debería considerar los efectos directos e indirectos, como así también los costos y beneficios económicos y no económicos. Por ejemplo, *Rubus fruticosus* L., una de las 20 malezas más importantes del sur de Australia, reduce la accesibilidad a los lugares donde crece, reduce la producción de las pasturas, impide el establecimiento de otras especies vegetales y reduce la biodiversidad (James y Lockwood, 1998). No obstante, estos costos están contrabalanceados por beneficios, ya que esta especie es fuente de néctar y polen para insectos, aumentando la producción de miel y disminuyendo la erosión hídrica en los bancos de arena de los ríos (Sinden *et al.*, 2005).

La competencia, una de las interacciones negativas más documentadas, es el proceso a través del cual dos o más organismos próximos interactúan por los recursos (*i.e.* agua, luz, nutrientes y espacio) o por los servicios (polinizadores) del ambiente, que están provistos en cantidades insuficientes para satisfacer los requerimientos combinados de individuos de la misma especie (intraespecífica) o de distintas especies (interespecífica) (de Wit, 1960). Sin embargo, varios estudios demuestran la importancia de otro tipo de interacción: la alelopatía (Rice, 1984; Delabays *et al.*, 2001; Barney *et al.*, 2005), definida como el efecto directo o indirecto, en el sentido más

estricto negativo, que produce la liberación al medio de compuestos químicos, sobre el establecimiento, crecimiento y desarrollo de individuos de la misma u otra especie (Seigler, 1996; Inderjit *et al.*, 2001). La competencia y la alelopatía difieren en el intermediario que media la relación (recurso *vs* aleloquímico, respectivamente), ya que la alelopatía depende de los compuestos químicos que se liberan al ambiente mientras que la competencia involucra la remoción o reducción de los recursos del ambiente que son requeridos por algún individuo (*i.e.* planta, microorganismo) compartiendo un mismo hábitat (Rice, 1987; Rizvi y Rizvi, 1992). No obstante, desde el punto de vista ecofisiológico, se pueden considerar estrechamente ligadas y complementarias en sus efectos (Weidenhamer, 2006).

En los agroecosistemas, numerosas malezas liberan aleloquímicos afectando varios procesos (Wardle *et al.*, 1998) en los cultivos (Singh *et al.*, 2001), como la germinación, el establecimiento de plántulas, el crecimiento, la reproducción y/o el desarrollo (Rice, 1979; Inderjit y Mallik, 2002).

Cerca de 240 especies de malezas de diferentes hábitos de crecimiento y ciclos de vida generan efecto aleloquímico negativo sobre un amplio rango de cultivos a través de diferentes mecanismos (Kohli *et al.*, 2001). Por ejemplo, malezas como *Abutilon theophrasti* Medik. (Bhowmik y Doll, 1984), *Agropyron repens* L. (Weston y Putman, 1986), *Carduus nutans* L. (Wardle *et al.*, 1993), *Chenopodium album* L. (Porwal y Gupta, 1986), *Cyperus rotundus* L. (Tang *et al.*, 1995) y *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (Bhowmik y Doll, 1979) y *Artemisia annua* L. (Lydon *et al.*, 1997), afectan el crecimiento de especies de leguminosas (Rice, 1984) a través de los lixiviados de partes aéreas.

El género *Artemisia* abarca más de 500 especies herbáceas y arbustivas, siendo uno de los más grandes y más amplios de la familia de las Asteráceas. Marco y Barbera (1990) destacan la relevancia de varias especies de este género con actividad alelopática hacia otras especies. En el caso particular de altamisa (*Artemisia annua*), es una maleza del cultivo de soja (de la Fuente *et al.*, 1999 y 2006; Faccini y Puricelli, 2007), que deprime el crecimiento de otras especies vegetales, a través de la competencia y de su actividad alelopática fitotóxica (Duke *et al.*, 1987; Weston, 1996; Weston y Duke, 2003).

La soja es susceptible a la acción de sustancias alelopáticas de otras especies. Azania *et al.* (2003) demostraron que la tasa de crecimiento y el rendimiento de la soja son afectados por la presencia de aleloquímicos en el suelo provenientes del lixiviado de plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) en activo crecimiento o de residuos de hojas, tallos y raíces. Asimismo, los aleloquímicos liberados al ambiente edáfico de esta especie (Batlang y Shushu, 2007) y de especies de malezas como ser *C. album* (Batish *et al.*, 2007), afectan la nodulación y en consecuencia, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Weston y Putman, 1985).

1.1.2 Aleloquímicos: características, síntesis y liberación

Las plantas producen metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios, tienen una amplia distribución en todos los organismos y están íntimamente involucrados en los procesos esenciales en el ciclo de vida (*i.e.* carbohidratos, aminoácidos) (Herbert, 1981). Los metabolitos secundarios, en cambio, se caracterizan por tener una distribución restringida en plantas y microorganismos, son característicos del género, especie o variedad y se sintetizan a través de pasos metabólicos especializados (*i.e.* ruta del mevalónico y shikímico). Los metabolitos secundarios,

también conocidos como aleloquímicos (Whittaker y Feeney, 1971), también son importantes para los organismos que los producen por sus funciones ecológicas (Wink, 2003). Considerando la similitud estructural y de propiedades de las moléculas, la ruta de biosíntesis puede clasificarse en diferentes grupos: fenilpropanos, acetogeninas, esteroides, alcaloides y terpenoides (Einhelling, 1986). Dentro de este último grupo se encuentran la artemisinina y los constituyentes del aceite esencial mayoritariamente responsables de los efectos alelopáticos. En altamisa, ambos tipos de compuestos son sintetizados en estructuras especializadas y diferenciadas llamadas tricomas glandulares, distribuidos principalmente en las hojas (Ferreira y Janick, 1995) y en menor proporción en corolas y receptáculos de flores (Delabays *et al.*, 2001). El aceite esencial de *A. annua* es una mezcla compleja de compuestos naturales (Waterman, 1993), de amplia diversidad en estructuras químicas de bajo peso molecular, que se caracteriza por ser intensamente aromático, volátil, insoluble en agua y soluble en alcohol y solventes apolares (grasas, ceras y aceites vegetales) (Gershenzon y Croteau, 1991; Ferreira *et al.*, 2005).

En las plantas, la producción y concentración de los aleloquímicos está condicionada por el genotipo, el tipo de órgano o tejido (Kelsey y Everett, 1995) y las condiciones del ambiente. Estas condiciones ambientales incluyen el estrés físico (*i.e.* temperatura, radiación; Gershenzon, 1984), químico (herbicidas; Weidenhamer y Callaway, 2010) o biológico (*i.e.* patógenos y herbívoros; Biere *et al.*, 2004).

Los aleloquímicos que se sintetizan y acumulan en hojas, tallos, raíces, flores y frutos pueden ser liberados a través de cuatro vías (Aldrich, 1984): (i) *volatilización* hacia la atmósfera, donde los compuestos pueden ser adsorbidos por plantas vecinas por medio del vapor de agua y la condensación del rocío o también pueden alcanzar el suelo y ser absorbidas por las raíces, (ii) *exudación* de las raíces hacia el ambiente edáfico; (iii) *descomposición* de los órganos caídos de las plantas y (iv) *lixiviación* por lluvia, rocío o riego, provocando la liberación y transporte de compuestos de los órganos aéreos hacia el suelo o directamente hacia las plantas circundantes o también desde los residuos vegetales depositados sobre el suelo hacia el ambiente radical. En los agroecosistemas, los residuos de las plantas alelopáticas pueden permanecer en la superficie del suelo (Sodaeizadeh *et al.*, 2010) o ser incorporados en la matriz del mismo a través de los sistemas de labranzas (Weston, 1996). Así, los aleloquímicos presentes en el suelo dependerán, por un lado, de la disponibilidad estática (*i.e.* disponibilidad existente en el suelo) y por otro, de su dinámica (*i.e.* tasa de liberación, de degradación o pérdida) (Williamson y Weidenhamer, 1990).

Por lo expuesto, considerando que la persistencia de los aleloquímicos en la matriz del suelo es muy dinámica, el efecto de estos compuestos, puede darse durante la misma estación de crecimiento del cultivo o en los ciclos posteriores (Rice, 1984) ante la presencia de rastrojos o incorporación de los residuos en el suelo. Asimismo la existencia de diferentes fuentes de aleloquímicos, como por ejemplo, (i) planta/s alelopática/s conviviendo con el cultivo, (ii) residuos frescos de la maleza (iii) rastrojo o residuos de la estación de crecimiento anterior y (iv) aleloquímico o una mezcla combinada de diferentes fuentes aplicados en forma directa, pueden variar el tipo y el umbral de respuesta en la especie receptora.

1.1.3 Efectos directos e indirectos de la alelopatía

En toda interacción alelopática existe una planta que libera al ambiente compuestos químicos, planta emisora, (*i.e.* *A. annua*) afectando uno o más procesos,

directa o indirectamente, en otra especie receptora (*i.e.* *G. max*). El *efecto directo* de los aleloquímicos liberados por la planta emisora se traduce en cambios bioquímicos y fisiológicos de varios procesos del metabolismo y crecimiento de la planta receptora. El efecto directo de los aleloquímicos puede evidenciarse a través de (i) la inhibición de la mitosis en raíces (Rice, 1974), (ii) cambios en la permeabilidad de las membranas celulares (Harper y Balke, 1981), (iii) alteración de la respiración y síntesis proteica (Rice, 1974) y (iv) disminución del nivel de clorofila (Sodaeizadeh *et al.*, 2010). Mientras que los *efectos indirectos* de los compuestos alelopáticos pueden ser resultado de (i) la alteración de las propiedades físicas o químicas del suelo (ii) la degradación o transformación por la flora y fauna del suelo de compuestos no alelopáticos en alelopáticos, o viceversa, y (iii) la inducción sobre la síntesis y/o liberación de compuestos biológicos activos por parte de otros organismos (Inderjit y Weiner, 2001).

Numerosos estudios demuestran que los aleloquímicos liberados al ambiente por varias especies de malezas deprimen no solo el crecimiento de los cultivos (Lydon *et al.*, 1997; Batish *et al.*, 2007), sino también de los microorganismos como *Rhizobium leguminosarum* y *R. japonicum*, afectando la fijación biológica del nitrógeno en especies de leguminosas (Rice, 1979). Consecuentemente, la nutrición del cultivo puede reducirse como resultado de la reducción del tamaño de nódulos y de la disminución en la síntesis de la leghemoglobina en los mismos (Birkett *et al.*, 2001). Por ejemplo, en especies de leguminosas como *Pisum sativum* L. y *Cicer arietinum* L. se evidenció una disminución en la nodulación y el crecimiento ante dosis crecientes de ácidos fenólicos provenientes de residuos en el suelo de la maleza *Chenopodium murale* L. (Batish *et al.*, 2007).

En este contexto, es importante dilucidar en los estudios de la alelopatía si los efectos directos o indirectos observados se deben (i) a la concentración de un aleloquímico en particular o a la combinación de varios o, (ii) a la sensibilidad de uno o varios sitios o procesos específicos en la planta receptora.

1.1.4 Impacto de la microflora del suelo sobre los aleloquímicos

La presencia de un aleloquímico en la planta emisora y su actividad fitotóxica en un medio artificial de cultivo (*i.e.* agar) no explica necesariamente la actividad alelopática en condiciones naturales (Inderjit, 2005). La microflora del suelo genera cambios cuali y cuantitativos de los aleloquímicos presentes en el mismo (Inderjit y Weiner, 2001) y estos cambios a su vez, pueden generar variaciones en la composición microbiana edáfica (Bever, 2003). La degradación microbiana de los aleloquímicos del suelo ha sido estudiada en diversos aspectos (Vokou *et al.*, 2006) pero aún es poco el conocimiento acerca del rol de la microflora del suelo, sobre la degradación o potencialidad del efecto en la especie receptora (Kaur *et al.*, 2009).

Los aleloquímicos deben acumularse, persistir a niveles fitotóxicos y estar en contacto con las especies receptoras de estos compuestos, para que la alelopatía sea un mecanismo ecológico relevante en el crecimiento de las plantas en condiciones de campo (Inderjit, 2005). En este sentido, el nivel de los aleloquímicos y su persistencia en el suelo, está determinado por los procesos de retención (adsorción), transporte y transformación. Asimismo las diferentes fuentes de aleloquímicos u órganos (*e.g.* hojas, flores) (Jafari *et al.*, 2011) y el tipo de compuesto (*e.g.* artemisinina, aceite esencial) como las condiciones físicas, químicas y biológicas del tipo de sustrato o suelo (*e.g.* arcilloso, arenoso) también juegan un rol importante en determinar la persistencia de los aleloquímicos en el suelo (Chaves Lobón *et al.*, 2002; Popa *et al.*, 2008). La adsorción

de los aleloquímicos en las partículas del suelo, la descomposición química y/o la degradación de estos compuestos a través de la microflora del suelo son los principales mecanismos que aumentan, reducen o neutralizan la fitotoxicidad de estos compuestos y de esta manera, influyen en el crecimiento de las plantas receptoras (Inderjit, 2001; Kaur *et al.*, 2009) (Fig. 1.1).

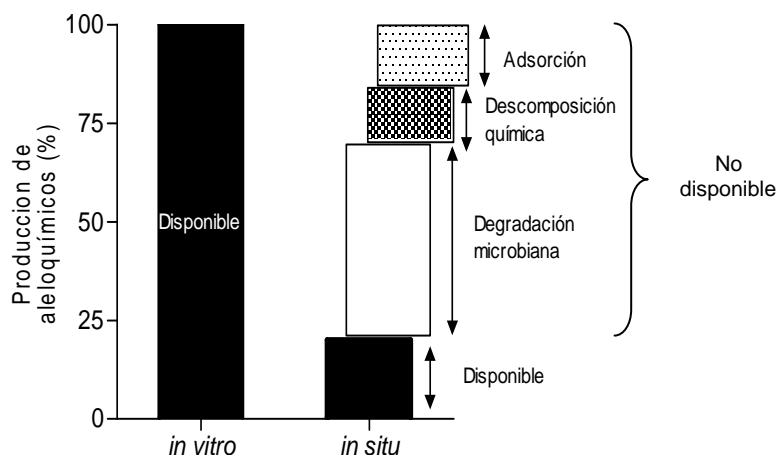


Figura 1.1 Descripción esquemática de las fracciones disponibles y no disponibles de un determinado aleloquímico producido y liberado por una planta en condiciones experimentales *in vitro* comparada con un experimento *in situ*, en el que se incluyen el suelo y la composición microbiana asociados al mismo. (Adaptado de Kaur *et al.*, 2009).

En algunos casos, la adsorción física de los aleloquímicos en el suelo puede concentrar el o los compuestos a niveles fitotóxicos (que tienen un efecto fisiológicamente activo). De esta manera, el mecanismo de adsorción puede determinar tanto un rol positivo como negativo de la alelopatía. En este contexto, son necesarios más estudios a fin de entender la compleja interacción de los microorganismos del suelo y los aleloquímicos presentes en el mismo. Además, es necesario reconocer que las condiciones ambientales en términos de factores físicos, como la temperatura y la humedad inciden sobre las interacciones entre la microflora del suelo (*i.e.* hongos y bacterias), los compuestos liberados y las especies vegetales involucradas, produciendo retrocontroles positivos y negativos sobre el crecimiento de las plantas (Bever, 2003).

Existen numerosos microorganismos del suelo, *i.e.* bacterias fijadoras de N, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, micorrizas arbusculares y endofitos, entre otros, que pueden afectar el crecimiento y rendimiento de las especies vegetales. La soja, como el resto de las leguminosas, tiene la habilidad de asociarse de forma simbiótica con un grupo de bacterias fijadoras de N llamadas rizobios, más precisamente del género *Bradyrhizobium*. Estos microorganismos, encargados de la fijación biológica del N, transfieren entre un 80 a 90 % del N fijado a la planta (Maddonni *et al.*, 2003). La importancia de la fijación biológica está dada no sólo por la cantidad de N que aporta sino también porque dicho aporte se produce mayoritariamente durante el llenado de los granos de soja (R5, Fehr y Caviness, 1977), cuando los requerimientos se hacen máximos, disminuyendo así la retraslocación y, por lo tanto, la senescencia foliar. En este contexto, debido a la importancia del aporte de N fijado en el cultivo de soja y a la sensibilidad de estas bacterias fijadoras a los aleloquímicos (Rice, 1979; Batish *et al.*, 2007), es necesario estudiar la relación soja-

Bradyrhizobium. Conocer los efectos de los aleloquímicos sobre la relación soja-*Bradyrhizobium*, contribuiría al diseño de prácticas que eviten o minimicen las consecuencias negativas y potencien las positivas al sistema, con el fin de lograr un manejo agrícola más sustentable.

1.1.5 Efecto del estrés biótico y abiótico sobre los aleloquímicos

Una planta o individuo está estresado cuando se produce alguna alteración en algún estado fisiológico (absorción de agua o nutrientes, fotosíntesis, respiración, crecimiento, desarrollo o reproducción, entre otros) por debajo del estado máximo expresado en condiciones óptimas de crecimiento (Salisbury y Ross, 1992). En particular, existen numerosos factores del ambiente que producen estrés y pueden limitar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Levitt (1980) los clasificó en, causantes del estrés biótico y abiótico en las plantas, respectivamente (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1 Factores del ambiente abiótico y biótico y antrópicos causantes de estrés en las plantas (Adaptado de Reigosa *et al.*, 2002).

Factores de estrés		
Factores ambientales		Factores antrópicos
Factores abióticos	Factores bióticos	
<ul style="list-style-type: none"> - Temperaturas: bajas o muy altas - Agua: déficit o exceso - Radiación: exceso o déficit - Químicos: suelos salinos, deficiencia o excesivos minerales, inadecuado pH - Otros: vientos, presión 	<ul style="list-style-type: none"> - Patógenos: virus, hongos, bacterias - Animales: pastoreo, pisoteo - Otras plantas: parasitismo, alelopatía, competencia 	<ul style="list-style-type: none"> - Herbicidas, fungicidas, insecticidas - Lluvia ácida - Exceso de nitrógeno - Eutrofización - Fuego - Compactación de suelos - Polución - Liberación de CO₂ a la atmósfera

El concepto general y más aceptado de “estrés” en las plantas fue desarrollado con dos objetivos principales: (i) distinguir entre los cambios homeostáticos en respuesta a pequeñas fluctuaciones ambientales diarias y la real respuesta al estrés, como “plástica” (permanente en el ciclo de la planta, tiempo ontogénico, aclimatación) o “adaptativa” (tiempo evolutivo, heredable); y (ii) establecer una clara distinción entre un factor de estrés (una señal externa) y la respuesta al estrés (los efectos y las restricciones inducidas por las condiciones de estrés en la planta). (Reigosa *et al.*, 2002).

La plasticidad fenotípica o aclimatación en las plantas es la habilidad que posee un mismo genotipo para ajustar su morfología y fisiología en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Gianoli, 2004). Existe abundante evidencia de la plasticidad de las plantas en la producción de metabolitos secundarios en respuesta a un estrés abiótico o como mecanismo de defensa ante la herbivoría y el parasitismo (Gershenson, 1984). La respuesta más frecuente ante la ocurrencia de un estrés, biótico o abiótico, es un incremento en la producción de los metabolitos secundarios, sin embargo no todos los compuestos químicos responden de la misma manera (Einhelling, 1999).

Los estreses bióticos (enfermedades y herbivoría) y abióticos (déficit de nutrientes, radiación o agua y temperaturas extremas) y las herramientas de manejo que el hombre utiliza en el sistema agrícola (*i.e.* herbicidas y otros químicos) (Einhelling, 2001) pueden modular la síntesis y emisión y la respuesta esperada a los aleloquímicos. En la planta emisora, muchos de estos estreses generan un incremento en la síntesis, almacenamiento y liberación de aleloquímicos, y su persistencia en el ambiente (Fig. 1.2) y, consecuentemente, en la toxicidad de los compuestos lixiviados desde los tejidos de las plantas (Inderjit y Weiner, 2001). Por ejemplo en girasol, la producción de fenoles (aleloquímicos) en los tejidos se promueve en respuesta a estreses generados por herbicidas, deficiencia de nutrientes (N, K, Mg, S) y bajas temperaturas (Hall *et al.*, 1982). En el caso particular de altamisa, un estrés abiótico por radiación (Liu *et al.*, 2002), temperatura (Guo *et al.*, 2004), salinidad (Qian *et al.*, 2007) y metales pesados (Qureshi *et al.*, 2005) como el arsénico en altas concentraciones, incrementan el contenido de artemisinina en hoja (Rai *et al.*, 2011). La composición de los aleloquímicos (*i.e.* aceite esencial) también pueden ser afectados no solo por diferencias en la oferta de recursos en un sitio en particular (*e.g.* suelo, fertilidad, radiación, precipitaciones), sino además por diferentes niveles de estrés biótico y abiótico (Sangwan *et al.*, 2001).

Asimismo, la síntesis y la liberación de los aleloquímicos (Harborne, 1997; Gershenzon *et al.*, 2000), como la artemisinina, no sólo pueden afectar directamente el crecimiento de las plantas vecinas (Weston, 1996), sino que además pueden, indirectamente, modular la susceptibilidad de esas plantas a otros estreses (Connell, 1990; Einhelling, 1996). Por ejemplo, los ácidos fúlvico y húmico (aleloquímicos) liberados por *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh modulan la toxicidad al aluminio presente en el suelo, en plantas de maíz (*Zea mays* L.) (Harper *et al.*, 1995). Asimismo los herbicidas que regulan la competencia entre el cultivo y la maleza, pueden actuar en forma aditiva, sinérgica o antagonista con la alelopatía (Einhelling, 1996). Dosis subletales de herbicida aplicados en plantas susceptibles, como fuente de estrés, provocan un aumento en la producción de los metabolitos secundarios (Vila-Aiub y Ghersa, 2005; Weidenhamer y Callaway, 2010).

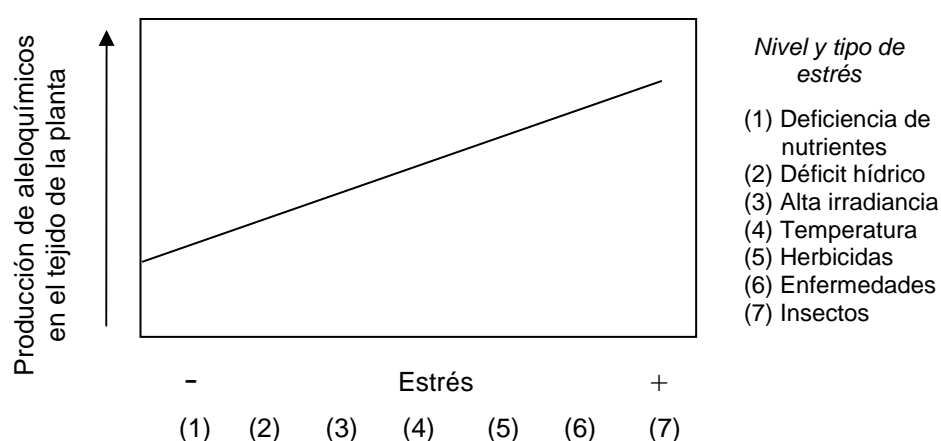


Figura 1.2 Esquema teórico del aumento de la concentración de un aleloquímico en el tejido de una planta u órgano en función del incremento en el nivel de estrés, generado por factores bióticos y abióticos (1 a 7). (Adaptado de Einhelling, 1999).

Por otro lado, los eventos de estrés pueden incrementar la susceptibilidad a los aleloquímicos en la especie receptora (Einhelling, 1999). Paralelamente, la disminución del crecimiento o del proceso afectado en el cultivo, dependerá también de la duración e intensidad del estrés, así como del período o momento de ocurrencia en el ciclo ontogénico del cultivo.

El efecto alelopático está relacionado con la acción de uno o más compuestos químicos (Inderjit y Weiner, 2001). Lydon *et al.* (1997) demostraron que la tasa de emergencia y el crecimiento de plantas de soja es menor cuando, además de la artemisinina, están presentes otros terpenos foliares de altamisa, evidenciando que la actividad alelopática estaría dada por un conjunto de compuestos químicos, más que por un solo compuesto aislado.

El crecimiento de un cultivo puede afectarse a partir de una concentración dada de compuestos químicos en el ambiente dependiendo del nivel de estrés. Este efecto puede ser de estimulación o inhibición de un proceso dependiendo de que la concentración de aleloquímicos supere o no un determinado umbral de concentración. Dicho umbral variará en función del compuesto, la especie y el proceso involucrado y de la incidencia de un estrés ambiental (Fig.1.3, Einhelling, 1999).

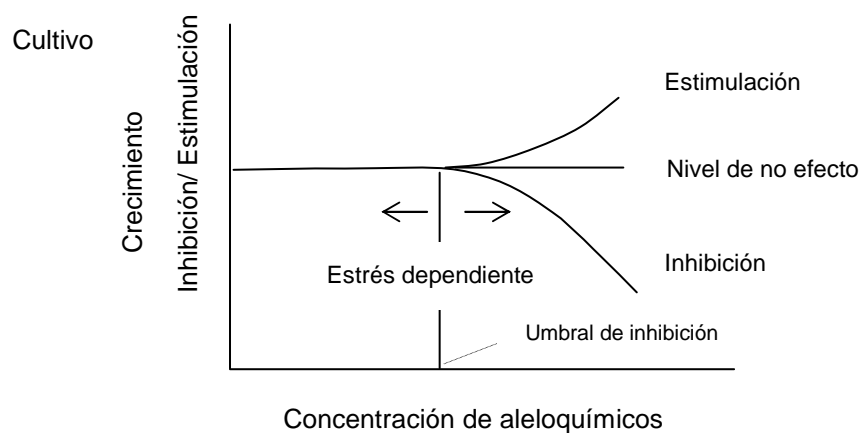


Figura 1.3 Esquema teórico de la respuesta en el crecimiento de una especie ante aumentos en la concentración de aleloquímicos. El umbral de inhibición variará en función del compuesto, especie y proceso involucrado y del estrés ambiental. (Adaptado de Einhelling, 1999).

1.1.5.1 Aleloquímicos y los efectos denso-dependientes

La densidad de plantas por unidad de superficie puede generar cambios en el nivel de estrés al cual están expuestas las plantas en un cultivo y de esta manera incidir sobre el crecimiento y rendimiento. La respuesta a la densidad del rendimiento de soja por unidad de superficie presenta generalmente una respuesta del tipo asintótica. A bajas densidades el rendimiento por unidad de área se incrementa proporcionalmente con el aumento de la densidad del cultivo. Luego el incremento deja de ser lineal, ya que el rendimiento se incrementa menos que proporcionalmente cuando empieza la competencia. Finalmente, el rendimiento llega al máximo cuando la competencia por recursos es plena (Fig. 1.4 a). En los cultivos que presentan este tipo de respuesta el rendimiento por planta es máximo a bajas densidades y va disminuyendo ante el

aumento de la densidad cuando comienza la competencia, siendo la producción por unidad de área compensada por el mayor número de individuos (Kira *et al.*, 1953).

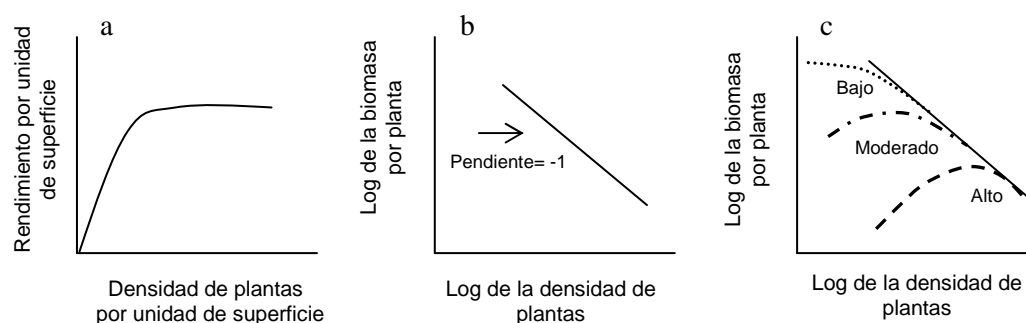


Figura 1.4 (a) Respuesta del rendimiento de soja por unidad de superficie a la densidad. (b) Relación entre el logaritmo de la biomasa media por planta y logaritmo de la densidad en el rango de densidades donde el rendimiento es constante. (c) Efecto de los aleloquímicos sobre el rendimiento y la densidad. Las curvas representan la desviación esperada con respecto a la relación representada en (b) ante bajas, moderadas y altas concentraciones de aleloquímicos en el suelo. (Adaptado de Weidenhamer *et al.*, 1989).

Para describir la respuesta asintótica del rendimiento a la densidad se han propuesto varias aproximaciones, entre ellas, las ecuaciones recíprocas que hacen lineal la respuesta por unidad de área y proveen una interpretación biológica simple de los parámetros de la ecuación. En el rango de densidades donde el rendimiento permanece constante, la relación entre el logaritmo del peso medio de la planta y el logaritmo de la densidad es lineal con una pendiente (*b*) negativa de -1 (Fig. 1.4 b). La recíproca de la ordenada al origen es considerada un estimador del “potencial genético” de las plantas individuales del cultivo en cada ambiente. La pendiente es una medida de cómo disminuye el peso por planta a medida que se adiciona una planta a la población. Asimismo, si la relación entre la densidad y el rendimiento es verdaderamente asintótica, la inversa de la pendiente podría ser considerada una medida del “potencial ambiental”. Los factores ambientales como la disponibilidad de recursos, pueden modificar el rendimiento máximo alcanzado y, por lo tanto, su potencial ambiental sin generar cambios en la pendiente de la recta, es por ello que se denomina Ley de rendimientos constantes o Leyes de Kira (Weidenhamer, 2006).

Sin embargo, Weidenhamer *et al.* (1989), encontraron que la presencia de ciertos aleloquímicos en el suelo puede causar desviaciones de la relación esperada entre el rendimiento y la densidad del cultivo (Fig. 1.4 c). Podría encontrarse una respuesta distinta, dependiendo de la concentración de aleloquímicos en el suelo, donde el máximo tamaño por planta se manifestaría a densidades intermedias, mientras que a bajas densidades (por efecto de los aleloquímicos) y a altas densidades (debido a la intensa competencia), disminuiría el tamaño individual por planta. Por ejemplo, estudios en soja demuestran la existencia de una interacción significativa entre la fitotoxicidad dada por el herbicida atrazina aplicado en el suelo y la densidad de dos plantas competidoras (soja-maíz). A altas concentraciones de atrazina, la biomasa individual de soja se incrementa con altas densidades de maíz (Thijs *et al.*, 1994; San Emeterio *et al.*, 2007). Estos resultados ponen en evidencia que, por un lado, la respuesta asintótica (ley de los rendimientos constantes de Kira) puede variar ante la presencia de compuestos fitotóxicos en el suelo y la magnitud del efecto será función no sólo de la densidad de la especie emisora sino también de la especie receptora (*i.e.* efecto denso-dependiente).

(Weidenhamer, 2006). Por otro lado, los resultados comentados sugieren que la interacción química juega un rol protagónico (dependiendo de la densidad de la especie emisora) y por consiguiente, la competencia no es el único factor que afecta la biomasa de las plantas receptoras.

1.1.6 Aproximaciones experimentales al estudio de las interferencias

La competencia puede ser estudiada a través de distintos tipos de diseños experimentales, no obstante, es importante que el diseño experimental permita responder las preguntas planteadas en cada caso (Connolly *et al.*, 2001). La competencia es un proceso denso-dependiente, por ello la densidad de plantas es una variable muy importante al estudiar este proceso. Por ejemplo, en los agroecosistemas las malezas sólo ejercen un efecto competitivo sobre el cultivo si la densidad supera un determinado umbral. Existen distintas aproximaciones experimentales generales para analizar el efecto de la densidad sobre la competencia.

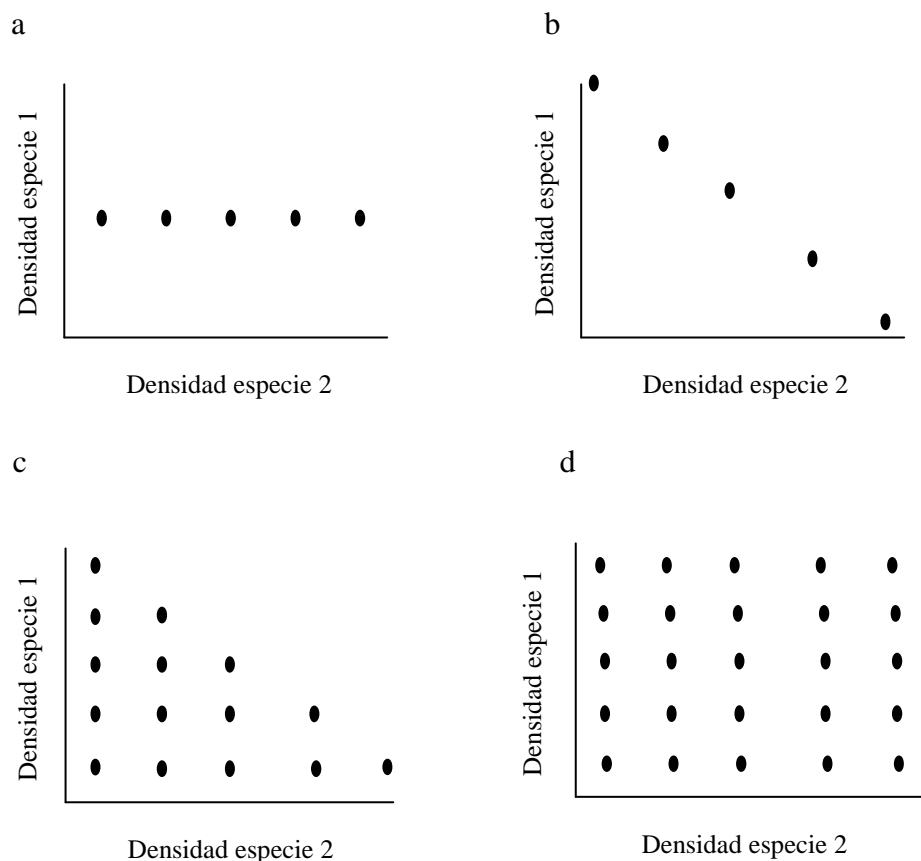


Figura 1.5 Diseños experimentales utilizados mas frecuentemente para el estudio de la competencia. Cada punto representa una combinación determinada de densidades cultivo-maleza. (a) Aditivo, (b) Sustitutivo, (c) Aditivo en series (d) Binario factorial completo. (Adaptado de Connolly *et al.*, 2001).

La principal diferencia entre los modelos aditivo, sustitutivo, aditivo en series y binario factorial completo (Fig. 1.5) es la variación de la densidad total de individuos de la mezcla y la proporción de cada especie en la mezcla. En un modelo aditivo (Fig. 1.5

a) la densidad total de individuos varía ya que la densidad de una especie, por lo general el cultivo, permanece constante mientras que la segunda especie, en general la maleza, varía en un amplio rango de densidades. Este diseño es útil cuando se estudia el efecto del incremento de la densidad de un componente sobre el otro componente del sistema y generalmente se utiliza en experimentos donde se evalúa el efecto de la densidad de la maleza sobre el rendimiento del cultivo (Buchanan *et al.*, 1980). En cambio, en un modelo sustitutivo (Fig. 1.5 b), la densidad de la mezcla se mantiene constante, mientras que varía la densidad relativa de cada especie dentro de la mezcla. Este modelo es útil para analizar la habilidad competitiva de cada especie en la mezcla.

Por otro lado, los modelos aditivo en series y completo aditivo (o binario factorial) (Fig. 1.5 c y d) incorporan la proporción y la densidad dentro del diseño. En estos experimentos la densidad total y la densidad relativa de cada especie varían. La diferencia entre estos tipos de modelos radica en que, en el completo, se utilizan todas las combinaciones de densidades posibles. A pesar de que son muy útiles, y dan un mejor entendimiento de los efectos competitivos, ya que utilizan todas las combinaciones de densidades, son caros y requieren mayor tiempo para su realización.

A pesar de que los modelos sustitutivos han sido ampliamente utilizados (Golberg y Werner, 1983), muchos investigadores han dejado de usarlos ya que al no distinguir el efecto de la densidad total y la densidad de cada especie, se confunde el efecto de la competencia interespecífica con la intraespecífica (Snaydon, 1991). Por el contrario, los modelos aditivos son utilizados con el objetivo de diferenciar el efecto de la maleza sobre el rendimiento del cultivo, persiguiendo objetivos agronómicos. Esto se debe, como lo demuestran Firbank y Watkinson (1990), a que la principal limitante de los modelos aditivos (cierta confusión entre el efecto de la proporción y de la densidad de las especies en la mezcla) es simplemente irrelevante a los objetivos de los experimentos que usan el modelo aditivo.

Muchos trabajos que analizan la complejidad de las interacciones alelopáticas y competitivas (Inderjit y del Moral, 1997; Blum *et al.*, 1999), con especial énfasis en el diseño experimental (Weidenhamer, 1996; Romeo y Weidenhamer, 1998), desafortunadamente, desestiman la complejidad ecológica de estas interacciones (Romeo, 2000; Weidenhamer, 2008) confundiendo ambos tipos de interacciones a campo (Weidenhamer, 2006 y 2008).

1.1.7 Escala de análisis de la competencia y la alelopatía

Existen diferentes aproximaciones de análisis de la alelopatía. En general, los estudios que demostraron que las malezas pueden interferir con el cultivo a través de la alelopatía, fueron realizados en condiciones de laboratorio y utilizando técnicas manipulativas (Inderjit *et al.*, 2001; Inderjit y Callaway, 2003).

Una de las mayores objeciones acerca de los estudios de alelopatía es el uso de medios de crecimiento no naturales en bioensayos de laboratorio (Inderjit y Nilsen, 2003). Mientras que en los experimentos a campo se cuestiona que muchas veces se confunden la competencia y la alelopatía. Si bien los bioensayos son importantes para entender los mecanismos, no permiten predecir la operación conjunta de los aleloquímicos y sus interacciones en la naturaleza (Inderjit y Weston, 2000). A pesar de que se conocen los mecanismos y los efectos aislados de la competencia y la alelopatía, se sabe poco acerca de su interacción y de la contribución relativa de cada uno de ellos cuando actúan en conjunto (Nilsson, 1994). Pocos estudios lograron estimar, en condiciones de cultivo a campo la importancia relativa de la alelopatía y de la

competencia (Waller y Einhellig, 1999; Inderjit *et al.*, 2001; Inderjit y Callaway, 2003). En la actualidad, es frecuente que el diseño de sistemas de manejo agrícola se sustente en modelos de respuesta a factores independientes (*i.e.* herbicida, densidad) desconociendo las interacciones (Grace y Tilman, 1990; Radosevich *et al.*, 1997) y los efectos indirectos de los mismos (Radosevich *et al.*, 2003).

Como se describió anteriormente, una de las interferencias más estudiadas es la competencia por los recursos del ambiente, evidenciada a través del aumento continuo en el número de publicaciones a lo largo de 40 años (Fig. 1.6). Sin embargo, en los últimos 10 años hubo un incremento muy importante (104 %, con respecto a la década anterior) en los estudios de la alelopatía. De los cuales, sólo un 31 % corresponden a trabajos donde se analizan conjuntamente las interferencias alelopáticas y competitivas y solo un 20 % de trabajos sobre alelopatía en condiciones naturales, de campo (1079 publicaciones en “Alelopatía en campo” del total de 5365 en “Alelopatía”). Esta información pone de manifiesto que, si bien el estudio de la competencia resulta de gran importancia en las investigaciones, en los últimos años, la alelopatía ha tomado relevancia como temática bajo estudio. No obstante, solo una pequeña fracción de estas investigaciones ha sido considerada en condiciones de campo.

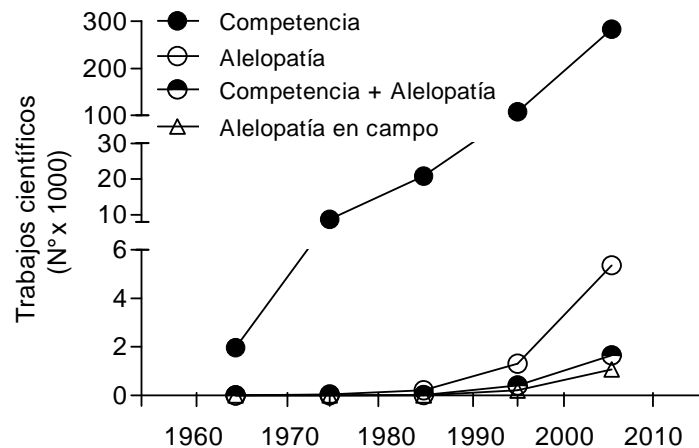


Figura 1.6 Trabajos científicos publicados desde 1960 hasta 2010 en revistas con referato internacional relacionados con la competencia, alelopatía, competencia y alelopatía y alelopatía en condiciones de campo. (Información extraída de la base de datos Scopus 2011 considerando las palabras claves: “allelopathy”, “competition” y “field conditions” en el título y el texto.

Hasta el presente, no existen evidencias en la literatura que involucren el estudio de la respuesta del cultivo (crecimiento, nodulación y rendimiento) de soja (Grupo de Madurez, GM IV) a variaciones de la densidad de altamisa, maleza alelopática y a la aplicación de herbicida en dosis subletales. Como tampoco existen trabajos en los que se evalúen las interferencias de competencia y alelopatía en condiciones de campo en el sistema soja-altamisa y son muy escasos los evaluados en otros sistemas.

1.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1 Hipótesis general

En este contexto es posible postular la siguiente hipótesis:

Las interferencias competitivas y alelopáticas generadas en un sistema soja (*Glycine max* (L.) Merr.) - altamisa (*Artemisia annua*), y reguladas por la densidad de plantas y aplicación de herbicida, afectan la nodulación, el crecimiento y el rendimiento del cultivo de soja.

1.2.1.1 Hipótesis y predicciones específicas

En la especie alelopática altamisa, la ocurrencia de un evento de estrés biótico (e.g. herbivoría) o abiótico (e.g. déficit hídrico), provoca un incremento en la producción de aleloquímicos en hojas e inflorescencias (Marchese *et al.*, 2010), según la intensidad y duración del estrés. Sin embargo, no existen evidencias acerca del efecto de estrés por competencia (interespecífica) y herbicida (dosis subletales) sobre la producción y composición de aleloquímicos en altamisa y su acumulación en suelo y menos aún su relación con la producción de la soja en condiciones de campo. Estos antecedentes hacen necesaria una revisión del comportamiento de la maleza alelopática y el efecto que estos estreses causan tanto en la especie emisora (altamisa) como en la receptora (soja). En este contexto, se presentan las hipótesis 1 y 2, y sus respectivas predicciones.

Hipótesis 1(i): El aumento en la densidad de plantas de altamisa, al favorecer la acumulación de aleloquímicos en el medio edáfico, afectan negativamente la nodulación, el crecimiento o el rendimiento del cultivo de soja.

Hipótesis 1(ii): La interacción de los factores de densidad y herbicida en dosis subletales, al aumentar más marcadamente la acumulación de aleloquímicos en el suelo, reducen aún mas la nodulación, el crecimiento o el rendimiento que los factores individuales.

Predicción 1(i): La mayor producción de aleloquímicos en la biomasa aérea de altamisa y su acumulación en el medio edáfico, en respuesta al aumento de la densidad, reducirá la nodulación, el crecimiento o el rendimiento de soja (Fig. 1.7 a, tendencia i).

Predicción 1(ii): El efecto combinado de la densidad y el herbicida sobre la nodulación, crecimiento o el rendimiento será mayor que el efecto de sus factores individuales (Fig. 1.7 a, tendencia ii).

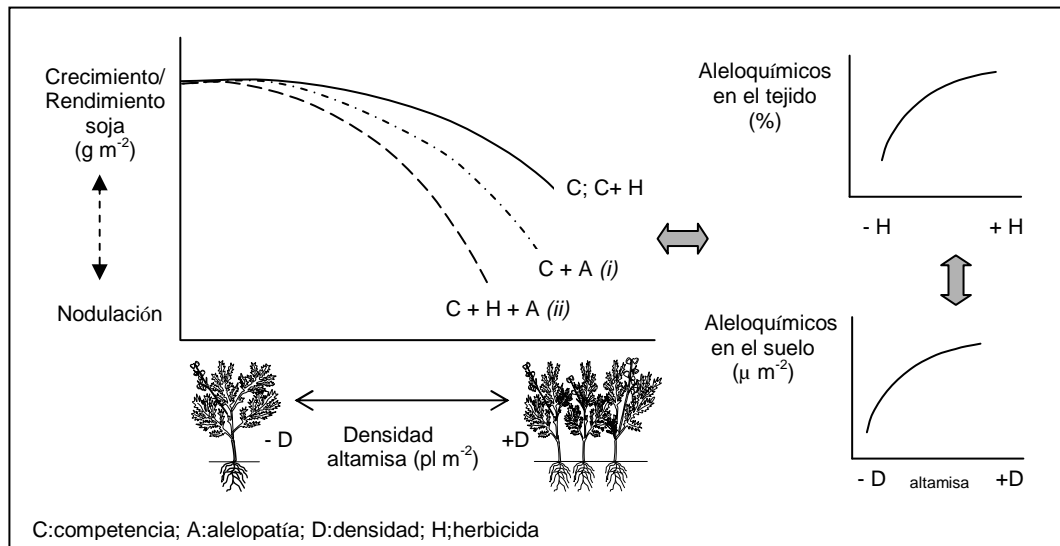


Figura 1.7 a Representación esquemática de las predicciones de las hipótesis 1.

Hipótesis 2 (i y ii): La densidad de plantas de altamisa, al aumentar la producción de hojas e inflorescencias (H e I) por superficie: (i) incrementa la acumulación de artemisinina en el medio edáfico y (ii) aumenta la concentración (%) del aceite esencial en H e I.

Hipótesis 2 (iii): La aplicación de herbicida en dosis subletales, al afectar el crecimiento de altamisa: reduce la producción de aleloquímicos (aceite esencial y artemisinina) por superficie pero aumenta su concentración en la biomasa de H e I, y reduce la acumulación de artemisinina en el medio edáfico.

Hipótesis 2 (iv y v): La alta densidad de altamisa y el herbicida en dosis subletales, incrementan la biomasa de altamisa pero por el efecto del herbicida la acumulación (g m^{-2}) de aleloquímicos (aceite esencial o artemisinina) se reduce, pero se incrementa su concentración en H e I. (v) Los componentes del aceite esencial responden diferencialmente al efecto combinado de la densidad y el herbicida.

Predicciones 2(i y ii): El aumento de la densidad de plantas de altamisa aumentará la producción de la biomasa de H e I por superficie. En consecuencia, se incrementará la concentración (%) por unidad de tejido del aceite esencial, y el nivel de artemisinina en el medio edáfico.

Predicción 2 (iii): La aplicación del herbicida glifosato reduce la biomasa de H e I, generando una menor producción de aleloquímicos, pero mayor concentración de estos compuestos en la maleza (%). Por consiguiente, la acumulación de artemisinina en el medio edáfico por lixiviación desde la parte aérea o desde las hojas y flores caídas al suelo será menor.

Predicciones 2 (iv y v): A altas densidades de altamisa y con dosis subletales se incrementará la biomasa de altamisa, pero la producción de aleloquímicos por superficie disminuirá y su concentración aumentará, por efecto del herbicida. (v): Ambos factores, densidad de plantas y herbicida en dosis subletales, provocarán una respuesta diferencial en los componentes del aceite esencial de altamisa. (Fig.1.8 b)

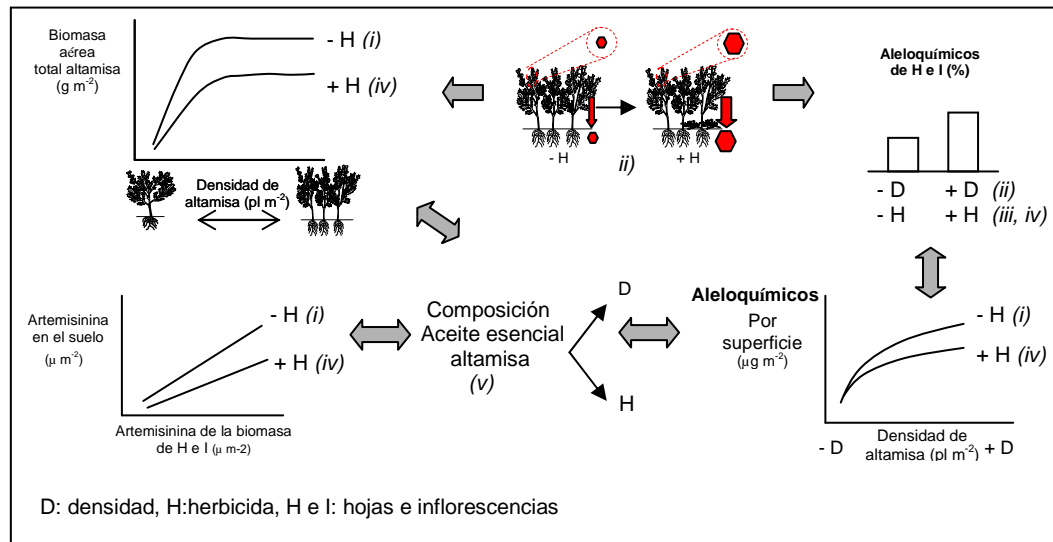


Figura 1.7 b Representación esquemática de las predicciones de las hipótesis 2.

Hipótesis 3: Diversas fuentes de altamisa (biomasa de altamisa verde, seca y artemisinina pura) y el tipo de sustrato (arcilloso o arenoso) impactan de manera diferencial sobre las concentraciones y la actividad de los aleloquímicos que se aportan al suelo. Esto produce variaciones en el modo en que se generan los efectos sobre el crecimiento, la nodulación, o el rendimiento de plantas de soja.

Predicción: La reducción en la nodulación, el crecimiento o el rendimiento en plantas de soja creciendo en un sustrato arenoso (con menos recursos), será mayor con respecto a los obtenidos en un sustrato arcilloso (más recursos). La menor reducción se obtendrá con la fuente de biomasa seca. (Fig.1.7 c)

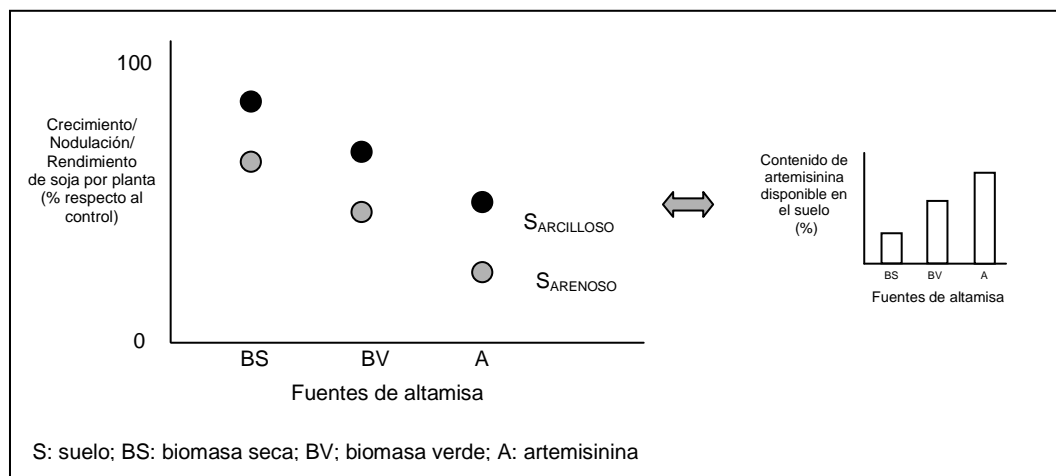


Figura 1.7 c Representación esquemática de las predicciones de la hipótesis 3.

Hipótesis 4 (i): Los aleloquímicos de altamisa (aceite esencial y artemisinina) influyen directa y negativamente sobre el crecimiento de *Bradhyrizobium japonicum*.

Hipótesis 4 (ii): El efecto de interacción del aceite esencial y la artemisinina sobre el crecimiento de la bacteria *B. japonicum* es mayor que sus efectos individuales.

Predicción (i): El crecimiento de *Bradhyrizobium japonicum* se reduce a medida que se incrementa la dosis de artemisinina y de esencia de altamisa.

Predicción (ii): La reducción será mayor cuando se combinan ambos aleloquímicos (aceite esencial y artemisinina) en el medio de cultivo (Fig.1.7 d).

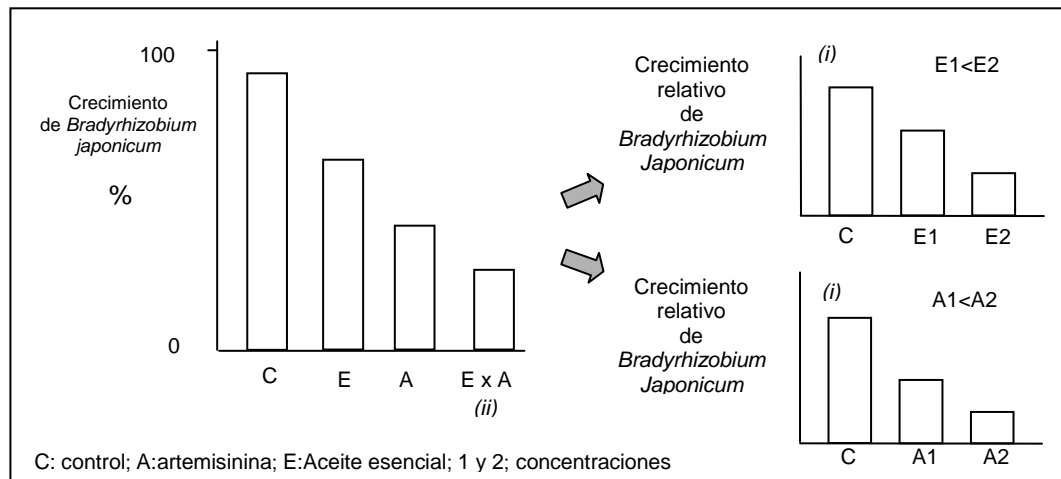


Figura 1.7 d Representación esquemática de las predicciones de la hipótesis 4.

1.2.3 Objetivo general

Evaluar la competencia y la alelopatía entre un cultivo de soja y altamisa (*Artemisia annua*) y su impacto sobre la nodulación, el crecimiento y el rendimiento del cultivo ante cambios en la densidad de plantas y la dosis de herbicida.

1.2.3.1 Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto de la densidad de plantas de altamisa y de dosis subletales de herbicida y de la acumulación de aleloquímicos al medio edáfico por parte de *A. annua*, sobre la nodulación, el crecimiento y el rendimiento en el cultivo de soja.
- 2) Determinar el efecto de la densidad de plantas de altamisa y de dosis subletales de herbicida sobre (i) el crecimiento de la biomasa de hojas e inflorescencias de altamisa (ii) la producción y acumulación de los aleloquímicos (aceite esencial y artemisinina) en la biomasa de hojas e inflorescencias de altamisa (iii) la composición del aceite esencial y (iv) la acumulación de artemisinina en el medio edáfico y su relación con la producción de soja.
- 3) Determinar el efecto de diversas fuentes de artemisinina (biomasa de altamisa, artemisinina pura) sobre el crecimiento, nodulación y rendimiento en plantas de soja creciendo en dos tipos de sustratos.
- 4) Testear el efecto directo de los aleloquímicos (aceite esencial y artemisinina) provenientes de altamisa sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum*.

1.3 METODOLOGÍA GENERAL

El estudio se ejecutó utilizando distintas aproximaciones experimentales, en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA), Argentina (34° 35'S, 58° 29'O).

Para llevar a cabo los objetivos propuestos y poner a prueba las hipótesis formuladas se realizaron experimentos, a campo en condiciones semi controladas (Exp. 1 y 2), en macetas en condiciones controladas (Exp. 3), conducidos en el campo experimental de la FAUBA durante tres campañas, y experimentos (Exp. 4 y 5) en

condiciones controladas de laboratorio (Fig. 1.8). Asimismo se condujeron tres ensayos preliminares para la definición de los tratamientos de carbón activado (Exp.1.1 y 1.2) y herbicida (Exp.1.3), vinculados a los Exp. 1 y 2.

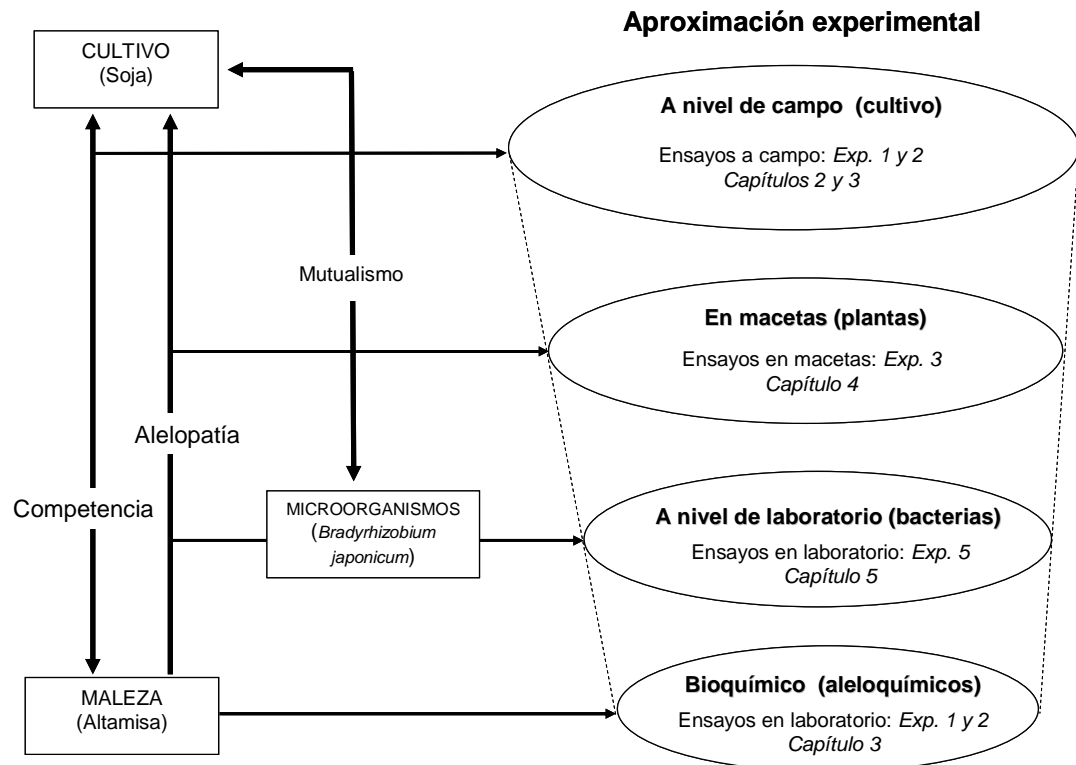


Figura 1.8 Diagrama de los ensayos realizados según su aproximación experimental y desarrollo en los capítulos de la tesis.

1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS

La tesis se estructuró en seis capítulos articulados entre sí (Fig. 1.9). En el primero se hizo una revisión de la literatura sobre el tema de la tesis, describiendo el estado del arte en el mismo, las hipótesis que se pusieron a prueba, llegando a los objetivos planteados, y la metodología general. En el Capítulo 2 se evaluó el efecto de altamisa sobre el crecimiento y la nodulación en el cultivo de soja ante cambios en la densidad de la maleza y aplicación de un herbicida en dosis subletales. En el Capítulo 3 se cuantificaron los aleloquímicos presentes en la maleza y en el suelo al variar la densidad de altamisa y ante la aplicación de herbicida y su efecto en el cultivo de soja. En el Capítulo 4 se estudió el efecto de las fuentes de artemisinina (biomasa de altamisa, artemisinina pura) sobre el crecimiento, nodulación y rendimiento en plantas de soja creciendo en dos tipos de sustratos. Finalmente, en el Capítulo 5 se analizó el efecto de los aleloquímicos de altamisa (artemisinina y aceite esencial) sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum*, bacteria responsable de la fijación biológica del N en soja.

En el capítulo final (Capítulo 6), se expuso la contribución de la presente tesis al conocimiento científico, se discutieron los hallazgos en el contexto de lo ya conocido, de las hipótesis y de los objetivos iniciales, y se hicieron proyecciones de las consecuencias y aplicabilidad de los resultados obtenidos en el manejo del cultivo de soja y de los agroecosistemas.

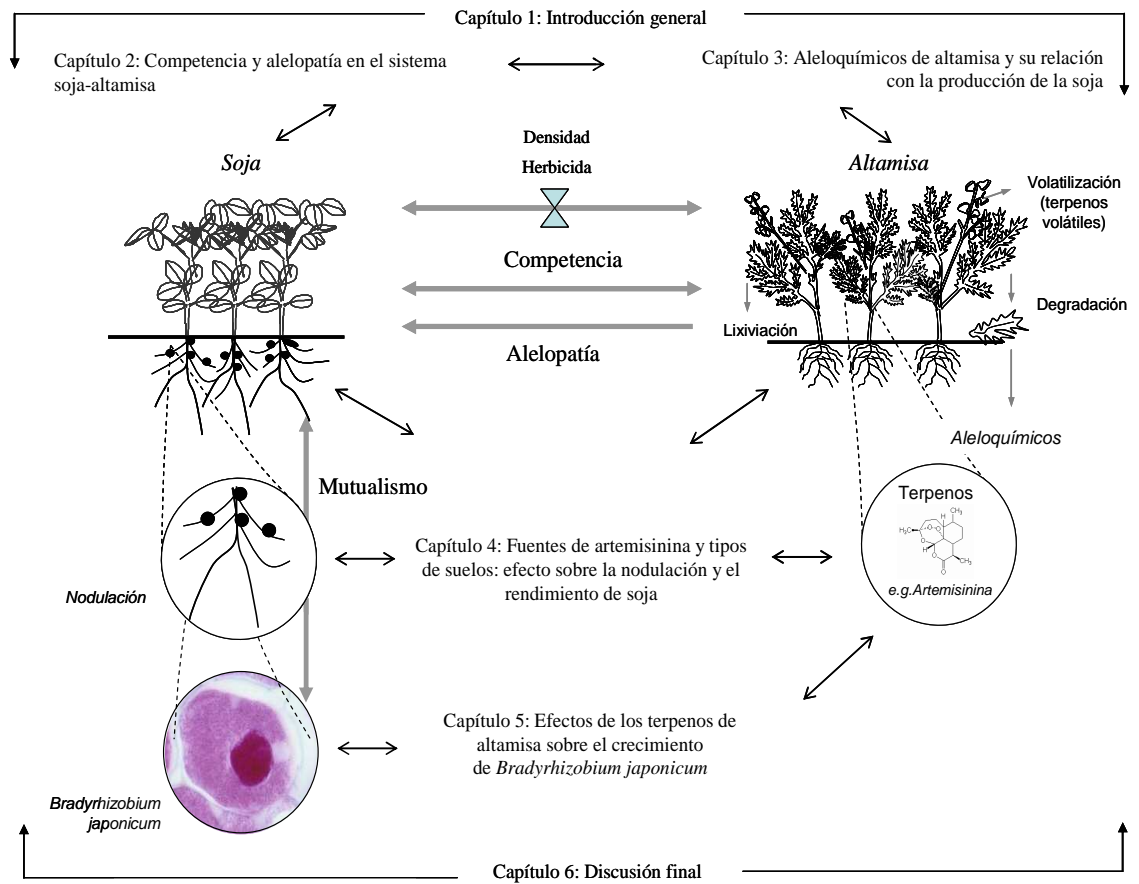


Figura 1.9 Diagrama esquemático de la estructura de la tesis.

CAPITULO 2

Competencia y alelopatía en el sistema soja-altamisa*

*Parte del contenido de este capítulo fue publicado en: Morvillo C.M, de la Fuente, E.B., Gil, A., Martinez-Ghersa, M.A. y González-Andújar, J.L. 2011. Competitive and allelopathic interference between soybean crop and annual wormwood (*Artemisia annua* L.) under field conditions. *European Journal of Agronomy* 34: 211-221.

2.1 INTRODUCCIÓN

Una de las interacciones negativas más documentadas es la competencia por los recursos (*i.e.* agua, luz, nutrientes y espacio) o por los servicios (polinizadores) del ambiente, que están provistos en cantidades insuficientes para satisfacer los requerimientos combinados de plantas de la misma especie (intraespecífica) o de distintas especies (interespecífica) (de Wit, 1960). Sin embargo, la alelopatía, definida como el efecto directo o indirecto de una planta hacia otra a través de la liberación de compuestos químicos (*i.e.* aleloquímicos) hacia el ambiente (Rice, 1984; Seigler, 1996), es otra interferencia importante, que afecta determinados procesos en la especie receptora de aleloquímicos. La alelopatía genera tanto efectos de estimulación como de inhibición entre las plantas (Molisch, 1937), afectando directamente el crecimiento, el desarrollo, el establecimiento y/o la reproducción (Inderjit y Mallik, 2002), e indirectamente, la nodulación en especies leguminosas (Batish *et al.*, 2007).

Altamisa (*Artemisia annua*) es una especie que integra la comunidad de malezas de los cultivos de soja (*Glycine max*) en la Pampa Ondulada de la Argentina (de la Fuente *et al.*, 2006; 2010). Esta maleza puede deprimir el crecimiento de otras especies vegetales, a través de la competencia y de su actividad alelopática fitotóxica (Weston y Duke, 2003). La actividad alelopática negativa de altamisa hacia los cultivos es atribuida, principalmente, al metabolito secundario artemisinina, clasificado como sesquiterpeno lactona (Duke *et al.*, 1987; Delabays *et al.*, 2001). Sin embargo, se sabe que otros compuestos químicos también presentes en altamisa (*e.g.* ácido artemisiníco y arteannuin B) estimulan la formación de raíces en especies leguminosas (Chen y Leather, 1990).

Los metabolitos secundarios se liberan al ambiente a través de la volatilización, la lixiviación y también a través de la exudación de raíces y/o la descomposición de los residuos (Harborne, 1997). Se sabe que en competencia interespecífica (*i.e.* con un cultivo de soja), altamisa pierde las hojas basales del tallo, y éstas ejercen su acción alelopática (Lydon *et al.*, 1997) al acumularse en la superficie del suelo y liberar los aleloquímicos.

Por su parte, la soja es susceptible a la acción de los aleloquímicos afectándose no sólo la nodulación y por consiguiente, la fijación biológica del nitrógeno (Rice, 1984) sino también, el crecimiento (Lydon *et al.*, 1997) y el rendimiento (Azania *et al.*, 2003).

Asimismo, los herbicidas que afectan la competencia entre el cultivo y la maleza, pueden actuar en forma aditiva, sinérgica o antagonista con la alelopatía (Einhelling, 1996). Por ejemplo, dosis subletales de herbicida pueden provocar un estrés en la especie emisora, que a su vez, genera un aumento en la producción de los metabolitos secundarios (Vila-Aiub y Ghersa, 2005; Weidenhamer y Callaway, 2010). Por otro lado, los eventos de estrés pueden incrementar la susceptibilidad a las fitotoxinas en la especie receptora (Einhelling, 1999).

La exposición voluntaria o involuntaria de dosis subletales de un herbicida es un evento muy común en poblaciones de malezas a campo (Vila-Aiub y Ghersa, 2005). En este contexto, se observó que las plantas de *Lolium multiflorum* L. incrementan el nivel de aleloquímicos en sus tejidos cuando son expuestas a dosis subletales del herbicida diclofop-methyl. Por otro lado, la aplicación de bajas dosis de herbicida glifosato causa un efecto depresor sobre *Bradyrhizobium japonicum* (Moorman *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1999) e inhibe la nodulación (Reddy, 2000) y/o la fijación biológica del nitrógeno en plantas de soja (Zablotowicz y Reddy, 2004).

Numerosos trabajos realizados en condiciones de laboratorio o en invernáculo (Inderjit y Nilsen, 2003) analizaron las interferencias entre un cultivo y una maleza alelopática como altamisa (Lydon *et al.*, 1997) y otras especies (Batish *et al.*, 2007), pero pocos estudios han investigado la importancia relativa de la competencia y la alelopatía en condiciones de campo (Nilsson, 1994; Inderjit *et al.*, 2001). Por lo tanto, conocer el efecto alelopático de altamisa sobre el cultivo de soja ante cambios en la densidad de plantas y la aplicación de herbicida es relevante a fin de mejorar las estrategias de manejo del cultivo.

El objetivo del presente capítulo es evaluar el efecto de distintas prácticas agrícolas (herbicida y densidad) y de la acumulación de terpenos al medio edáfico por parte de *Artemisia annua* sobre la nodulación, el crecimiento y el rendimiento en el cultivo de soja.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Sitio experimental

En el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34° 37'S, 58° 20'O), se realizaron dos ensayos, uno durante 2006 (Exp. 1) y el otro durante 2007 (Exp. 2). El suelo del campo experimental puede clasificarse como un Argiudol vértico (de acuerdo a la taxonomía del USDA, 1999, Anexo 2.1). Las condiciones meteorológicas (temperatura y precipitación) fueron registradas por la Estación Meteorológica Villa Ortúzar (34° 35'S, 58° 25'O) (Cuadro 2.1), distante a 300 m del área experimental.

Cuadro 2.1 Precipitaciones acumuladas (mm) y temperaturas máximas y mínimas (°C) registradas durante los meses del experimento en los años 2006 y 2007 por la Estación Meteorológica Villa Ortúzar.

Meses	Experimento 1			Experimento 2		
	Temperatura (°C)		Precipitaciones acumuladas (mm)	Temperatura (°C)		Precipitaciones acumuladas (mm)
	Máxima	Mínima		Máxima	Mínima	
Enero	36,6	14,9	33,3	35,4	12,7	70,9
Febrero	35,0	12,6	201,4	35,8	11,0	123,2
Marzo	30,1	7,1	149,4	31,1	11,6	0,3
Abril	28,4	4,6	69,6	31,4	5,2	0,0
Mayo	24,7	-0,3	1,7	24,9	-2,1	0,0

Previo a la siembra, se extrajeron muestras de suelo a fin de determinar los niveles de nitrógeno, fósforo y potasio (Anexo 2.1) en los primeros 40 cm del perfil del suelo, discriminado cada 20 cm (0-20 cm y 20-40 cm). En dicho momento, el contenido de nitrógeno fue de 72 kg N-NO₃ ha⁻¹ y de 46 kg N-NO₃ ha⁻¹ para la profundidad de 0-20 y de 20-40 cm, respectivamente. La disponibilidad de fósforo a la siembra fue mayor a 20 mg kg⁻¹ (Bray y Kurtz, 1945). En cuanto al potasio, el nivel fue de 60,45 mg kg⁻¹. Dada la oferta de estos nutrientes en el suelo, no se aplicaron fertilizantes nitrogenados, fosforados o potásicos, debido a que la cantidad de nutrientes disponible fue suficiente para satisfacer la demanda del cultivo (Alvarez *et al.*, 2007).

2.2.2 Tratamientos y diseño experimental

El experimento estuvo compuesto por 20 tratamientos, resultado de una combinación factorial de: 5 niveles de densidad cultivo-maleza (soja/altamisa, plantas m^{-2}): *D1*, soja pura, 40/0 plantas m^{-2} ; *D2*, 40/2 plantas m^{-2} ; *D3*, 40/4 plantas m^{-2} ; *D4*, 40/8 plantas m^{-2} ; y *D5*, altamisa pura, 0/8 plantas m^{-2} ; dos niveles de carbón activado (alelopatía): *C-*, sin aplicación de carbón (con alelopatía) y *C+*, con aplicación de carbón (reducción de la alelopatía) y dos niveles de herbicida: *H-*, sin aplicación y *H+*, con aplicación de glifosato en dosis subletales. Las parcelas control fueron: soja pura (*D1*) y altamisa pura (*D5*) con la combinación de los tratamientos de carbón y herbicida (*C-*; *H-*), (*C+*; *H-*) (*C-*; *H+*) y (*C+*; *H+*), respectivamente.

El nivel de baja densidad de altamisa (*D2*, 2 plantas m^{-2}) se determinó en base a las investigaciones realizadas por Maynard (1985) y Delabays *et al.* (1993), quienes reportaron 1 planta m^{-2} y 2,5 plantas m^{-2} como bajas densidades, respectivamente. Los niveles de media y alta densidad (*D3* y *D4*, 4 y 8 plantas m^{-2} , respectivamente) de altamisa se determinaron en relación a las investigaciones realizadas por Simon *et al.* (1990) y por Benicio Pereyra, investigador de la Universidad de Campinas (UNICAMP, Brasil) (Comunicación personal).

El diseño experimental fue factorial en parcelas divididas (Fig. 2.1) con un arreglo en bloques completos al azar (DBCA, debido a la pendiente del sitio experimental) con 3 repeticiones, durante el 2006 y completamente aleatorizadas (DCA) con tres repeticiones durante el 2007. El tratamiento de densidad fue asignado a la parcela principal (64 m^2) mientras que la combinación de los tratamientos de carbón y herbicida fueron asignados a las sub-parcelas (16 m^2).

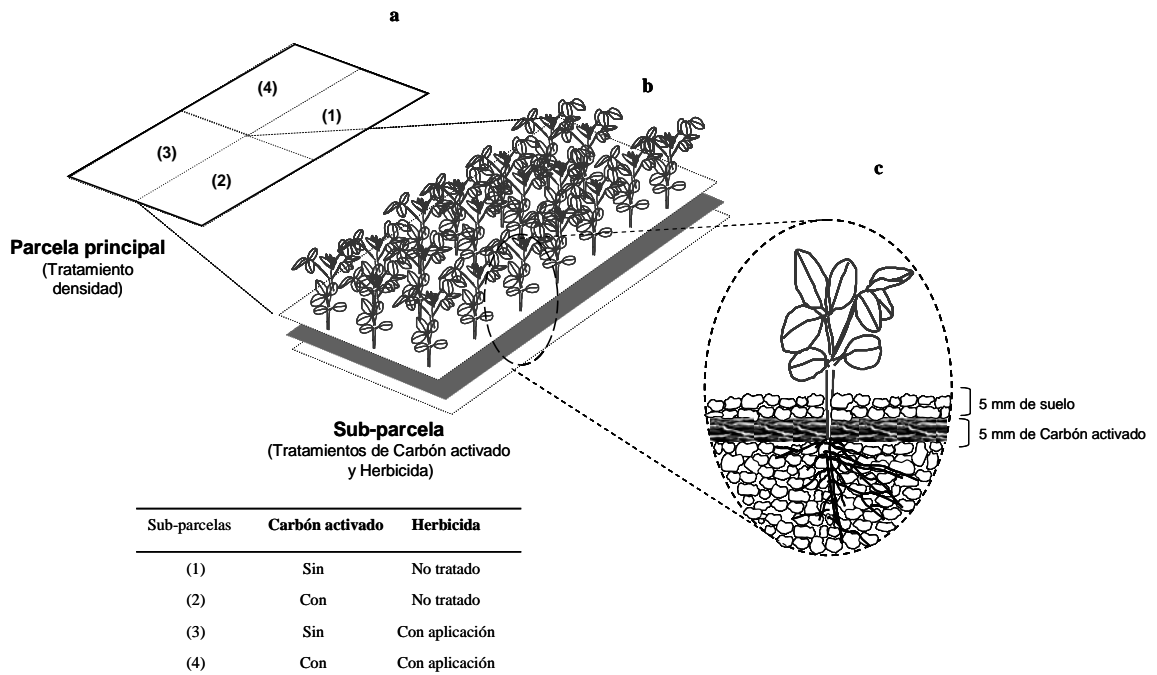


Figura 2.1 Esquema representativo de la parcela principal *D1*, soja pura (a), de la sub-parcela (b) y de una planta de soja (c), mostrando las capas de carbón activado (5 mm) y de tierra proveniente del mismo campo experimental (5 mm), adicionada a la parcela del nivel *C+*, con carbón. Nótese que el carbón fue aplicado manualmente a modo de “lámina” sobre las capas superficiales del suelo, con el objeto de minimizar la interacción del carbón con las raíces de la soja y de altamisa.

Las interacciones entre el cultivo y la maleza se estudiaron a través de un diseño experimental aditivo (Park *et al.*, 2003), es decir, manteniendo constante la densidad de soja (40 plantas m^{-2}) en cada parcela y aumentando la densidad de la maleza (2, 4 y 8 plantas m^{-2}).

El suelo se preparó mediante dos pasadas de disco y una pasada de rotovator, a fin de lograr una buena cama de siembra. El 18 de enero de 2006 y 2007 se sembraron semillas de soja del grupo de madurez IV resistente a glifosato (DM 4800), previamente inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* (10^9 UFC/g inoculante), a una densidad de 45 plantas m^{-2} , en parcelas de 16 surcos distanciados a 0,35 m y 2,8 m de longitud. Los surcos de las parcelas tuvieron una orientación Norte-Sur a fin de evitar el sombreado entre hileras. La siembra se efectuó cuidadosamente a fin de alcanzar una germinación y establecimiento de plántulas homogéneos. Las semillas de soja (con más de 98 % de poder germinativo) se colocaron manualmente en los surcos, luego se cubrieron con tierra y se compactaron levemente. En el momento de la emergencia del cultivo (VE, Fehr y Caviness, 1977), se ralearon las plantas de soja hasta alcanzar una densidad de 40 plantas m^{-2} . La maleza altamisa se sembró en bandejas de germinación bajo invernadero, 30 días antes de la siembra del cultivo para sincronizar la emergencia con la del cultivo. En emergencia del cultivo de soja (VE, Fehr y Caviness, 1977), se transplantaron las plantas de altamisa al entresurco, de acuerdo a los tratamientos de densidad. Los motivos por los cuales se realizó el transplante de altamisa en el campo fueron: (i) la semilla de altamisa es extremadamente pequeña ($P_{1000} = 0,03$ g) con lo cual es dificultosa su siembra directa en el campo y (ii) la necesidad de sincronizar el crecimiento de soja y altamisa. Al sembrar las semillas en las bandejas de germinación se tuvo en cuenta que las bandejas fuesen las de “tipo forestal”, de manera tal que posean suficiente profundidad y sustrato para el normal crecimiento de las raíces durante el período en el invernadero. El transplante se realizó durante las 8.00 y las 11.30 h de la mañana y desde las 16.00 h en adelante, evitando las horas de alta irradiancia, y por consiguiente el estrés por radiación y temperatura. Cada planta de altamisa transplantada en el campo se regó posteriormente, con el fin de minimizar el estrés post-transplante. Posteriormente al transplante se realizó un seguimiento de las plantas transplantadas de manera de asegurar los tratamientos de densidad de las parcelas.

El carbón activado permite separar de una forma sencilla la competencia de la alelopatía en parcelas experimentales a campo, adsorbiendo los compuestos orgánicos lixiviados por las plantas de altamisa y con poco efecto sobre los nutrientes inorgánicos (Inderjit y Callaway, 2003). Por lo expuesto, se utilizó carbón activado en las parcelas experimentales, con el fin de reducir la alelopatía (Nilsson, 1994) y de esta manera adsorber los aleloquímicos liberados por lixiviación, lavado y/o descomposición de los órganos aéreos de altamisa en condiciones de campo. En el estado vegetativo (V1) de soja (Fehr y Caviness, 1977) se aplicó 500 g m^{-2} (Nilsson, 1994) de carbón activado (Refil S.A. y Clarimex S.A.) enterrado subsuperficialmente en las subparcelas (C+), a fin de adsorber los aleloquímicos liberados por la parte aérea de *A. annua* de acuerdo a la metodología de Nilsson (1994) y a ensayos preliminares efectuados. Una capa del carbón activado se esparció sobre el suelo (500 g m^{-2}), y luego se cubrió con tierra (650 g m^{-2}) proveniente del mismo campo experimental con el objetivo de evitar la dispersión del carbón por efecto del viento y/o lluvia, considerando que las partículas del carbón utilizado son muy finas (37 μ , en el 80 % de las partículas) y para evitar diferencias de color y/o de temperatura entre las parcelas con y sin carbón activado (C+ y C-, respectivamente).

En el estado vegetativo de soja V4 (Fehr y Caviness, 1977) se aplicó el glifosato en dosis subletales ($1/8$ de la dosis comercial, $3 \text{ kg a.i. ha}^{-1}$). Diez días posteriores a la aplicación de herbicida se midió, con SPAD, el valor del índice de clorofila en hoja en las plantas de soja y altamisa, de manera de cuantificar a través de este indicador el nivel de estrés en las plantas (El-Hendawy *et al.*, 2005). El valor promedio SPAD se tomó sobre 6 mediciones realizadas en las hojas del 6° nudo (contando desde el ápice) de nueve plantas de altamisa evaluadas en cada tratamiento. En el caso de la soja se tomó la medición en el 3° nudo de la planta, contando desde el ápice. Al momento de medir esta variable en ambas especies, se consideró que la hoja estuviese totalmente expandida dentro del estrato medio de la planta (Anexo 2.2 *Confirmación del efecto del herbicida*).

Durante todo el experimento las plantas se regaron por aspersión y periódicamente de acuerdo a la demanda. En ambos años, el riego de las parcelas se realizó como suplemento a las precipitaciones naturales ($455,4 \text{ mm}$ en 2006 y $203,4 \text{ mm}$ en 2007, durante el ciclo del cultivo) con el objetivo de mantener el suelo cerca de capacidad de campo durante la estación de crecimiento del cultivo.

2.2.3 Ensayos preliminares que definieron la metodología y los niveles de los tratamientos

Carbón activado: Capacidad de adsorción y movilidad en el sustrato

Antes de utilizar el carbón activado se condujo un experimento en condiciones de laboratorio a fin de determinar (i) la capacidad de absorción del carbón activado y (ii) la probabilidad de mezcla del carbón activado con las capas de tierra en las parcelas experimentales. Para lograr el primer objetivo, se evaluaron tres concentraciones (0, control; $0,2 \text{ ml l}^{-1}$ y $0,5 \text{ ml l}^{-1}$) de artemisinina (Sigma-Aldrich 98 %). En un matraz aforado, se preparó la solución patrón disolviendo 6 mg de artemisinina en etanol ajustando dicho solvente hasta la marca de 6 ml . Posteriormente, se tomaron 3 alícuotas equivalentes a $0,2$ y 3 a $0,5 \text{ ml}$ de la solución patrón ($n=3$) y se colocaron en 6 vasos de precipitado conteniendo 2 g de carbón activado (equivalente a una capa de 5 mm de grosor). Los vasos de precipitado se conservaron a una temperatura de 20°C durante 2 días. El tratamiento control se realizó siguiendo los mismos pasos sin el agregado de la solución de artemisinina. El etanol se evaporó utilizando un rotavapor. Posteriormente, el carbón activado fue “lavado” con 10 ml de agua a fin de simular la lluvia y luego se agitó durante 10 minutos. El extracto acuoso se filtró y evaporó a través del rotavapor. El residuo se disolvió en etanol y luego se filtró con vacío. La solución obtenida se concentró y luego se transfirió a vasos de precipitado de 5 ml . El contenido de artemisinina de la solución etanólica se cuantificó a través de HPLC con detección UV en fase reversa con una columna de sílica C_{18} , según la metodología descrita por Qian *et al.* (2005). Las condiciones de trabajo del HPLC fueron las siguientes: fase móvil de 45/10/45 (volumen) metanol/acetonitrilo/ $0,9 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ - $3,6 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ buffer (pH 7.7), con un flujo de $0,5 \text{ ml/min}$. La longitud de onda del detector fue de 260 nm .

Considerando que la concentración de artemisinina del extracto acuoso proveniente del lavado del carbón activado fue de 0 % en todas las concentraciones de artemisinina evaluadas, se puede confirmar que la capacidad de absorción de artemisinina del carbón activado es total a los niveles de artemisinina estudiados. Por ello, se puede afirmar que el carbón activado actuó eficazmente como adsorbente en las parcelas experimentales con el objetivo de reducir los aleloquímicos, entre ellos la

artemisinina y otros compuestos de menor peso molecular, liberados por las hojas e inflorescencias de altamisa.

Con el propósito de determinar si la capa de carbón activado permanecía pura sin mezclarse con las capas de suelo durante el experimento, se dispuso de tres columnas (tipo Büchner), en donde se colocó una capa de suelo (10 mm), una capa de carbón activado (5 mm) y otra capa de suelo (10 mm). El suelo utilizado provino del campo experimental donde luego se realizaron los experimentos. La combinación de capas fue irrigada con agua (imitando la lluvia) cada dos días durante dos semanas. Posteriormente, se realizaron observaciones de las capas de suelo y carbón, confirmando que no hubo desplazamiento del carbón hacia los estratos inferiores o superiores del suelo.

Dosis de herbicida

La dosis subletal de herbicida se determinó mediante la evaluación de 4 dosis de glifosato (0, 1/2, 1/4 y 1/8 de la dosis comercial 3 kg *a.i.* ha⁻¹) sobre tres plantas de altamisa creciendo en el campo experimental (n=3). Con posterioridad a la aplicación del herbicida (15 días), se observaron visualmente (*e.g.* clorosis) las plantas, determinando la dosis subletal como 1/8 de la dosis comercial de glifosato.

2.2.4 Determinaciones

En la floración del cultivo (R1; Fehr y Caviness, 1977) se tomaron muestras de plantas enteras de soja en 2,1 m de surco (equivalente a 0.75 m²) de todos los tratamientos para cuantificar: biomasa aérea total acumulada, biomasa radical, número y biomasa de nódulos y la biomasa específica de nódulos (biomasa de nódulos/unidad de nódulo). Las muestras de suelo (2,1 m lineal de surco x 0,20 m ancho de surco x 0,25 m de profundidad) conteniendo las raíces primarias y secundarias y los nódulos se lavaron en una zaranda de 1 mm de diámetro. Posteriormente, las raíces se colocaron en el congelador dentro de bolsas de plástico hasta el momento de efectuar la separación de los nódulos en las raíces. Paralelamente, en la misma unidad experimental (parcela) se tomaron al azar 5 plantas de altamisa y se cuantificó la biomasa aérea total acumulada.

En la madurez de la soja (R8, Fehr y Caviness, 1977), se cosecharon las plantas de soja de los surcos centrales de las parcelas (equivalente a 0,75 m²), determinándose la biomasa aérea total acumulada y el rendimiento en grano. De cada unidad experimental, se cosecharon 5 plantas de altamisa a fin de determinar la biomasa aérea total acumulada. El peso seco de todas las variables se determinó colocando las muestras en estufa a 68 ° C de temperatura hasta alcanzar su peso constante.

2.2.5 Análisis estadístico

Los efectos principales y sus interacciones se analizaron a través de un análisis de varianza (ANVA) usando el paquete estadístico “General Linear Model” (GLM) del “Statistical Analysis System” versión 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, 2005). En el análisis se consideró al bloque o a la repetición, según el caso, como efectos aleatorios. Por otra parte, antes de realizar el análisis se evaluó si se cumplían los supuestos del ANVA (residuos homogéneos y aleatorios, distribución normal). De no cumplirse con estos supuestos, se transformaron los datos utilizando una función logarítmica para realizar el ANVA y se confeccionaron las figuras con los datos re-transformados (a través de la

aplicación de anti-logaritmo). Las medias se separaron usando el Test de Tukey a un nivel de significancia de $p < 0,05$. En el ANVA, el número de raíces fue considerado una covariable en el análisis del número y biomasa de nódulos para el año 2007, debido a la existencia de colinealidad entre el número de raíces y el número de nódulos ($R^2 = 0,18$; $p = 0,001$) y entre el número de raíces y la biomasa de nódulos ($R^2 = 0,17$; $p = 0,002$).

La relación entre la biomasa y el peso de nódulos se analizó a través del análisis de regresión, mediante una función potencial (Ecuación 1, $\hat{Y}_{ijk} = d X_{ij}^f$), donde \hat{Y}_{ij} representa la relación entre la biomasa y número de nódulos y X_{ij} , el número de nódulos para los i niveles del tratamiento de carbón ($i = C+$; $C-$), j niveles del tratamiento de herbicida ($j = H+$; $H-$) y k repeticiones. d y f son parámetros de la función.

Dado que hubo un gradiente de biomasa de la maleza en ambos años de experimento, generado a través de la densidad de plantas de altamisa, se realizó un análisis de regresión para describir la relación entre el rendimiento de soja y la biomasa total acumulada de altamisa a madurez. Para describir la respuesta del rendimiento ante el incremento de la biomasa de la maleza se utilizó una función hiperbólica (Ecuación 2) (Canner *et al.*, 2002). Para comparar los resultados de los experimentos de los dos años, los rendimientos de soja y la biomasa de maleza fueron expresados en valores relativos. Esto se realizó dividiendo el rendimiento o biomasa obtenida en cada subparcela y el rendimiento o biomasa correspondiente a cada sub-parcela control para cada año.

$$\hat{Y}_{ijk} = (a + b * X_{ij}) / (c + X_{ij}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde \hat{Y}_{ijk} representa el cociente entre el rendimiento de soja (g m^{-2}) y el rendimiento de soja en cada parcela control ($D1$) para los i niveles del tratamiento de carbón ($i = C+$; $C-$), j niveles del tratamiento de herbicida ($j = H+$; $H-$) y k repeticiones; X_{ij} representa el cociente entre la biomasa aérea total acumulada de altamisa (g m^{-2}) a madurez y la biomasa total acumulada de altamisa en cada parcela control ($D5$) para los niveles del tratamiento i carbon y j herbicida; $-a/b$ (Ecuación 2), es la cantidad de biomasa relativa de la maleza cuando \hat{Y}_{ijk} se aproxima a cero y a/c es la intercepción, *i.e.* el rendimiento relativo en ausencia de maleza. Las unidades de \hat{Y}_{ijk} y X_{ij} están expresadas en $\text{g m}^{-2} / \text{g m}^{-2}$ mientras que las unidades de a , b , y c son g m^{-2} .

Las ecuaciones 1 y 2 fueron analizadas utilizando el módulo de regresión no lineal del programa Sigma Plot v. 10. La bondad del ajuste de la relación fue evaluada a través del cuadrado medio residual (CMR), estimación de los parámetros, R^2 ajustado y la observación visual de los residuos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Efecto del carbón activado en las monoculturas D1 y D5 a floración y a madurez de soja

En relación al efecto del carbón sobre el crecimiento de las plantas de soja y altamisa a floración, no se encontraron diferencias significativas en las parcelas de las monoculturas ($D1$ y $D5$) asociadas al tratamiento con carbón activado sobre la producción de biomasa de soja y altamisa en floración (Fig. 2.2 a y b, en Anexo), biomasa y número de nódulos (Fig. 2.2 c y d, en Anexo), y biomasa y número de raíces (Fig. 2.2 e y f, en Anexo) de soja en los dos años de experimentos.

Al estadio fenológico de madurez de soja, tampoco se observó un efecto directo del carbón sobre el crecimiento del cultivo y la maleza, dado que la biomasa de soja y

altamisa y el rendimiento de soja de los estand puros (*D1* y *D5*) fueron similares en los tratamientos de carbón (*C+* y *C-*) para ambos años (Fig. 2.3, en Anexo).

2.3.2 Respuesta del cultivo a la interferencia de altamisa al estado de floración (*R1*)

(a) Biomasa del cultivo y altamisa: A floración, la biomasa aérea acumulada de soja fue similar en todos los tratamientos (Cuadro 2.2). Sin embargo en el año 2006, la aplicación de herbicida resultó en un aumento del 11 % de la biomasa (Cuadro 2.2) en comparación a las parcelas en donde no hubo aplicación de glifosato ($p=0,01$; Cuadro 2.3). Este incremento en la biomasa de soja está relacionado a la reducción (16 veces) de la biomasa de altamisa observada en las parcelas tratadas con dosis subletales en comparación con las no tratadas (16,62 vs 265,01 g m⁻²).

(b) Número de raíces y biomasa radical: En general el número y la biomasa de raíces de soja no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de herbicida y carbón. Sin embargo, en el experimento de la campaña 2007, en las parcelas (*D3* y *D4*) con una densidad de altamisa de 4 y 8 plantas m⁻² y con reducción de la alelopatía mediante carbón activado, el número de raíces fue significativamente menor en relación al cultivo puro (*D1*) ($p_{DxC}=0,03$) (Fig. 2.2). Entre densidades la biomasa de raíces difirió al nivel del 1 % en el 2007, observando una mayor biomasa de raíces de soja en el estand libre de competencia de altamisa (Cuadro 2.2 y 2.3).

Cuadro 2.2 Biomasa de soja y altamisa, biomasa y número de nódulos, biomasa y número de raíces de soja para los factores de densidad (*D*), carbón activado (*C*) y herbicida (*H*) durante el 2006 y 2007. Valores medios a la floración del cultivo (R1, Fehr y Caviness, 1977).

Año	Factor	Nivel Soja	Altamisa						
			Biomasa aérea en R1	Nódulos		Raíces		Biomasa aérea en R1 ¹	
				Biomasa	Número ¹	Biomasa	Número		
									(g m ⁻²)
2006	Densidad	D1	571,16	60,46	41,58	1,49	144,97	-	
		D2	523,76	53,86	40,66	1,24	77,31	27,99 a	
		D3	558,24	62,86	39,58	2,82	395,20	52,09 b	
		D4	497,57	51,98	36,50	2,30	249,28	117,84 c	
		D5	-	-	-	-	-	636,90 d	
	Carbón	C-	534,67	56,83	38,58	1,62 b	71,21 b	216,64	
		C+	540,69	57,75	40,58	2,30 a	362,17 a	143,77	
		Herbicida	H-	508,58	58,09	39,37	1,94	210,82	265,01 a
	H+	566,78	56,49	39,79	1,98	222,56	16,62 b		
	2007	Densidad	D1	487,34	40,82	43,66 a	7,54	673,11	-
			D2	496,91	40,23	38,77 ab	6,89	568,22	11,57
D3			481,07	42,19	34,55 b	4,54	318,56	21,31	
D4			496,65	38,94	37,33 b	5,92	518,67	34,03	
D5			-	-	-	-	-	316,08	
Carbón		C-	494,52	42,61	38,22	6,71	611,72 a	99,00	
		C+	486,47	38,47	38,94	5,73	427,56 b	99,78	
		Herbicida	H-	504,55	41,93	39,11	6,44	536,61	109,01
H+			476,44	39,16	38,05	6,00	502,67	90,60	

D, densidad; *C*, carbón activado; *H*, herbicida. ¹ Los datos fueron transformados logarítmicamente antes del análisis estadístico. Dentro de cada columna, las medias seguidas por una letra diferente indican diferencias significativas para el mismo factor y año, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ según el Test de Tukey.

Cuadro 2.3 Valores de probabilidad resultantes del análisis de varianza de la biomasa de soja y altamisa en floración (R1), biomasa y número de nódulos, biomasa y número de raíces de soja para los factores de densidad (*D*), carbón activado (*C*) y herbicida (*H*) durante el 2006 y 2007.

Año	Factor	g.l.	Valores de p del F-test					
			Soja			Altamisa		
			Biomasa aérea en R1	Raíces		Nódulos		Biomasa aérea en R1
				Biomasa	Número	Biomasa	Número	
2006	Bloque	2	0,32	0,47	0,92	0,82	0,97	0,60
	<i>D</i>	3	0,36	0,35	0,66	0,54	0,77	0,01
	Bloque x <i>D</i>	6	0,14	0,01	<0,01	<0,001	<0,001	0,04
	<i>C</i>	1	0,78	0,15	0,29	<0,01	<0,001	0,21
	<i>H</i>	1	0,01	0,29	0,97	0,94	0,84	<0,001
	<i>D</i> x <i>C</i>	3	0,07	0,64	0,13	0,15	0,21	0,36
	<i>D</i> x <i>H</i>	3	0,57	0,08	0,88	0,68	0,76	0,16
	<i>C</i> x <i>H</i>	1	0,92	0,25	0,24	0,82	0,80	0,83
	<i>D</i> x <i>C</i> x <i>H</i>	3	0,48	0,18	0,71	0,67	0,51	0,27
	Error	22						
2007	<i>D</i>	3	0,97	0,85	<0,01	0,91	0,79	0,97
	Repetición x <i>D</i>	8	0,41	0,42	0,82	<0,001	<0,001	0,41
	<i>C</i>	1	0,77	0,12	0,65	0,07	0,01	0,77
	<i>H</i>	1	0,31	0,29	0,51	0,98	0,62	0,31
	<i>D</i> x <i>C</i>	3	0,64	0,91	0,03	0,78	0,72	0,64
	<i>D</i> x <i>H</i>	3	0,63	0,95	0,53	0,44	0,37	0,63
	<i>C</i> x <i>H</i>	1	0,05	0,17	0,26	0,65	0,83	0,05
	<i>D</i> x <i>C</i> x <i>H</i>	3	0,54	0,65	0,56	0,20	0,26	0,54
	Error	24						

g.l., grados de libertad. Los números en negrita indican diferencias significativas al nivel de $p < 0,05$ del F-test.

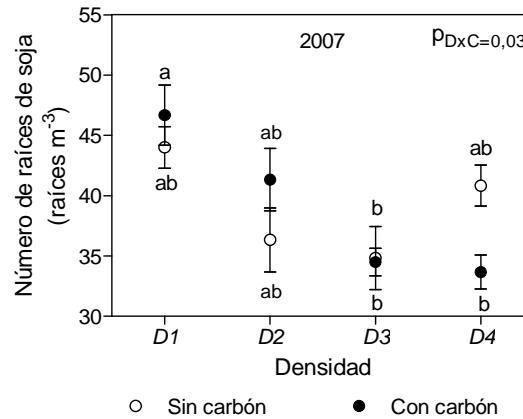


Figura 2.2 Efecto de la densidad (D) y el carbón activado (con carbón, símbolos llenos y sin carbón símbolos vacíos) sobre el número de raíces (raíces m^{-3}) en 2007. D , (soja/altamisa, plantas m^{-2}); $D1$, 40/0 plantas m^{-2} ; $D2$, 40/2 plantas m^{-2} ; $D3$, 40/4 plantas m^{-2} ; $D4$, 40/8 plantas m^{-2} . Las líneas verticales representan el error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias con y sin carbón según el Test de Tukey a un nivel de $p < 0,05$.

(c) Tamaño y número de nódulos: La relación entre la biomasa de nódulos y número de nódulos fue mayor en presencia de los aleloquímicos para ambos años de experimento, independientemente de la aplicación de herbicida (Fig. 2.3). La reducción de los aleloquímicos que ingresan al suelo a través de la aplicación de carbón activado afectó la nodulación, con un patrón diferente según el año. En el 2006 las raíces de la soja creciendo en las parcelas con carbón activado ($C+$), desarrollaron un mayor número y biomasa de nódulos en comparación con las parcelas sin carbón y con una menor biomasa específica de nódulos. Sin embargo, en el año 2007 el número de nódulos fue mayor en las parcelas con presencia de aleloquímicos en el suelo ($C-$), sin variaciones en la biomasa promedio (Cuadros 2.2 y 2.3) y biomasa específica de los nódulos (Fig. 2.4).

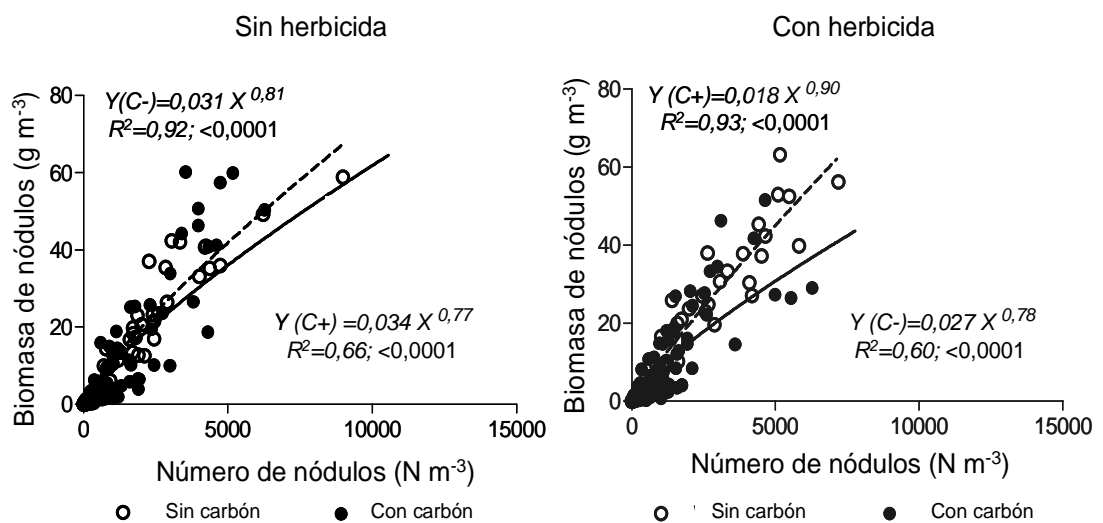


Figura 2.3 Relación entre la biomasa ($g m^{-3}$) y el número de nódulos ($N m^{-3}$). El modelo potencial (Ecuación 1, $\hat{Y}_{ijk}=d X_{ij}^f$) fue el que se ajustó para cada tratamiento de carbón ($C-$, $C+$) y herbicida ($H-$, $H+$).

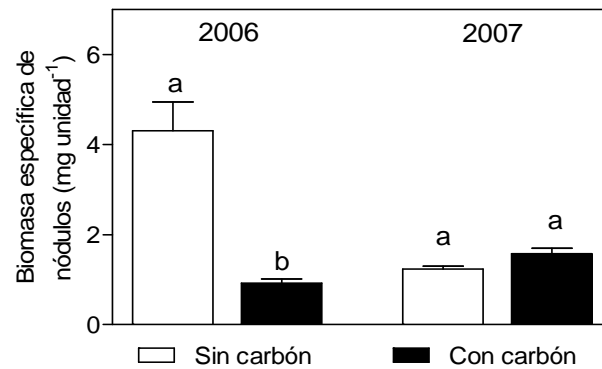


Figura 2.4 Efecto del carbón activado (sin carbón, barras blancas y con carbón, barras negras) sobre el biomasa específica de nódulos (mg unidad^{-1}) en 2006 y 2007. Las barras representan las medias y las líneas verticales el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas dentro de cada año, de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$.

Las diferencias observadas en las distintas variables (*i.e.* biomasa aérea de soja y altamisa, biomasa y número de raíces y nódulos) entre los tratamientos de carbón cuando la soja y la altamisa crecen en las mezclas (*D2*, *D3* y *D4*) no pueden atribuirse a un efecto directo del carbón activado sino a diferencias en la mayor o menor presencia aleloquímicos en el suelo, ya que, como se comentó anteriormente no se observó un efecto del carbón activado sobre el crecimiento de soja y altamisa (Anexo 2.3).

2.3.3 Respuesta del cultivo a la interferencia de altamisa a madurez (*R8*)

La biomasa de soja a madurez no difirió significativamente entre los tratamientos para ninguno de los años (Cuadros 2.4 y 2.5). Sin embargo, el efecto de interferencia de altamisa sobre el rendimiento de soja fue diferente según el año. En el 2006 el rendimiento de soja respondió al incremento de la densidad de altamisa en los tratamientos con carbón y herbicida como se observa en la triple interacción (*DxCxH*) ($p=0,01$; Cuadro 2.5). En los tratamientos sin herbicida, la presencia de altamisa en las mezclas con soja redujeron el rendimiento en grano, solo a altas densidades de altamisa (*D4*), y cuando se aplicó el carbón activado (Cuadro 2.5, Fig. 2.5).

En el año 2007, no hubo un efecto combinado entre los tratamientos de densidad, carbón y herbicida sobre el rendimiento en grano (Cuadro 2.5). Sin embargo, las altas densidades de plantas de altamisa (8 plantas m^{-2}) provocaron una disminución significativa del rendimiento de 269 g m^{-2} (*D2*) a 232 g m^{-2} (*D4*) ($p=0,02$; Cuadro 2.5).

Cuadro 2.4 Biomasa aérea y rendimiento de soja y biomasa de altamisa según los factores de densidad (*D*), carbón activado (*C*) y herbicida (*H*) durante el 2006 y 2007. Valores medios en la madurez del cultivo (R8, Fehr y Caviness, 1977).

Año	Factor	Nivel	Soja			Altamisa			
			Rendimiento		Biomasa aérea en R8	Biomasa aérea en R8 ¹			
			(g m ⁻²)		(g m ⁻²)		(g m ⁻²)		
2006	<i>Densidad</i>	<i>D1</i>	314,97	a	638,12		-		
		<i>D2</i>	331,57	a	682,38		143,69	a	
		<i>D3</i>	306,52	a	633,72		244,86	b	
		<i>D4</i>	264,90	b	573,36		287,66	c	
		<i>D5</i>	-		-		453,23	d	
	<i>Carbón</i>	<i>C-</i>	299,09		636,85		295,82		
		<i>C+</i>	309,89		626,94		269,24		
	<i>Herbicida</i>	<i>H-</i>	294,22		607,27		507,75	a	
		<i>H+</i>	314,76		656,52		46,94	b	
	2007	<i>Densidad</i>	<i>D1</i>	237,91	ab	658,15			
			<i>D2</i>	269,04	a	666,37		47,71	a
<i>D3</i>			264,52	ab	657,40		98,24	a	
<i>D4</i>			232,16	b	615,39		223,17	b	
<i>D5</i>			-		-		563,74	c	
<i>Carbón</i>		<i>C-</i>	254,52		656,03		245,32		
		<i>C+</i>	247,29		642,63		221,11		
<i>Herbicida</i>		<i>H-</i>	241,15		625,08		260,82	a	
		<i>H+</i>	260,66		673,58		205,61	b	

La interacción *D* x *H* de la biomasa de altamisa en R8 de ambos años se muestra en la Fig. 2.6. La interacción *D* x *C* x *H* del rendimiento de soja en el año 2006 se muestra en la Fig. 2.5. Los datos fueron transformados en base logarítmica y luego retransformados en su escala original. Dentro de cada columna, las medias seguidas por una letra diferente indican diferencias significativas para el mismo factor y año, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ según Test de Tukey.

Cuadro 2.5 Valores de probabilidad resultantes del análisis de varianza del rendimiento y biomasa de soja y biomasa de altamisa a la madurez de soja (R8) de los tratamientos de densidad (*D*), carbón activado (*C*) y herbicida (*H*) y sus interacciones en el año 2006 y 2007.

Año	Factor	g.l.	Valores de p del F-test		
			Soja	Altamisa	
			Rendimiento	Biomasa aérea en R8	Biomasa aérea en R8
2006					
	Bloque	2	0,62	0,95	0,62
	<i>D</i>	3	<0,01	0,34	<0,001
	Bloque x <i>D</i>	6	0,09	0,09	0,81
	<i>C</i>	1	0,48	0,71	0,68
	<i>H</i>	1	0,10	0,07	<0,001
	<i>D</i> x <i>C</i>	3	0,39	0,45	0,48
	<i>D</i> x <i>H</i>	3	0,58	0,51	<0,001
	<i>C</i> x <i>H</i>	1	0,62	0,21	0,79
	<i>D</i> x <i>C</i> x <i>H</i>	3	0,01	0,33	0,43
	Error	22			
2007					
	<i>D</i>	3	0,02	0,08	<0,01
	Repetición x <i>D</i>	8	0,97	0,98	0,06
	<i>C</i>	1	0,69	0,69	0,11
	<i>H</i>	1	0,28	0,18	<0,01
	<i>D</i> x <i>C</i>	3	0,98	0,85	0,36
	<i>D</i> x <i>H</i>	3	0,85	0,69	0,03
	<i>C</i> x <i>H</i>	1	0,77	0,78	0,65
	<i>D</i> x <i>C</i> x <i>H</i>	3	0,77	0,92	0,48
	Error	24			

g.l., grados de libertad. Los números en negrita indican diferencias significativas al nivel de $p < 0,05$ del F-test.

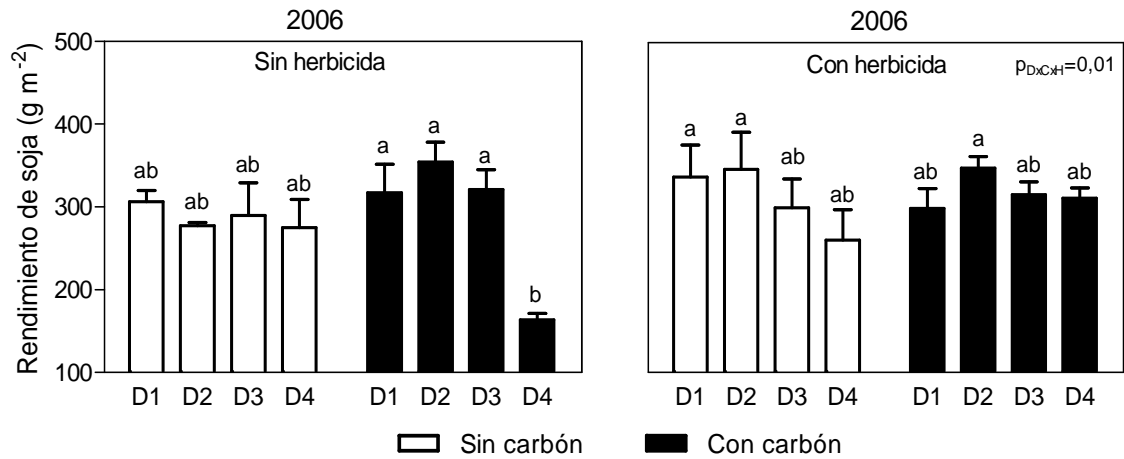


Figura 2.5 Efecto de la densidad (D), el herbicida (sin y con aplicación) y el carbón activado (sin, barras blancas y con, barras negras) sobre el rendimiento de soja (g m^{-2}) en el 2006. Las líneas verticales representan los desvíos estándares. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$. F-test significativo al nivel de $p < 0,05$.

En altamisa la diferencia entre densidades estuvo condicionada al nivel del herbicida en ambos años ($p_{D \times H} < 0,001$ en 2006 y $p_{D \times H} = 0,03$, en el 2007).

En el año 2006, la biomasa de altamisa se incrementó con el aumento de la densidad y fue significativamente reducida con la aplicación de herbicida (Fig. 2.6). En el nivel $D5$ (con 8 plantas m^{-2} de altamisa, stand puro) y sin aplicación de herbicida, la producción de biomasa fue de 763 g m^{-2} , mas del doble que en las mezclas ($D2$, 282 g m^{-2}). El herbicida redujo la biomasa de altamisa en todos los niveles de densidad. En los tratamientos con herbicida, hubo un aumento significativo de la biomasa de altamisa desde bajas densidades ($D2$, 4 g m^{-2}) a altas densidades ($D4$, 25 g m^{-2}) y ese aumento fue superior cuando se eliminó la interferencia de la soja ($D5$, 143 g m^{-2} , Fig. 2.6). En el 2007 y sin herbicida, la biomasa de altamisa se incrementó con el aumento de la densidad al comparar $D2$ (52 g m^{-2}) con los niveles $D4$ (302 g m^{-2}) y $D5$ (534 g m^{-2}), pero no hubo diferencias significativas entre estos dos niveles de densidad. Las diferencias observadas en el tratamiento con herbicida se debieron a que en ausencia de la soja ($D5$, 592 g m^{-2}) y a pesar de la aplicación de herbicida, la maleza produjo aproximadamente cinco veces más de biomasa en relación a las mezclas ($D2$, 43 g m^{-2} ; $D3$, 43 g m^{-2} y $D4$, 143 g m^{-2}) (Fig. 2.6).

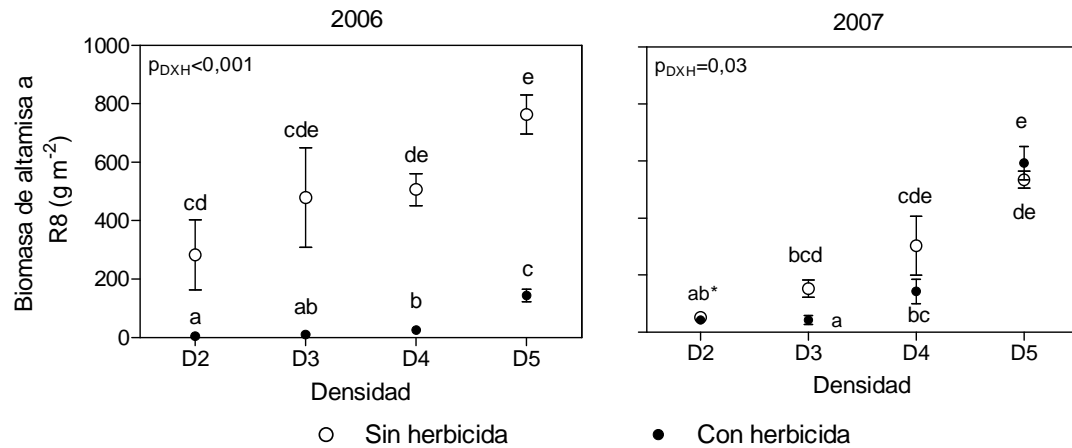


Figura 2.6 Efecto de la densidad (D) y el herbicida (sin y con aplicación) sobre la biomasa de altamisa (g m^{-2}) a R8 del cultivo (madurez fisiológica, Fehr y Cavinnes, 1977). D , (soja/altamisa, plantas m^{-2}); $D1$, 40/0 plantas m^{-2} ; $D2$, 40/2 plantas m^{-2} ; $D3$, 40/4 plantas m^{-2} ; $D4$, 40/8 plantas m^{-2} y $D5$, 0/8 plantas m^{-2} . Los símbolos representan las medias y las líneas verticales el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$. F-test significativo al nivel de $p < 0,05$. *Indica diferencias no significativas para un mismo nivel de densidad pero diferente nivel de herbicida.

El análisis de regresión mostró que el rendimiento relativo de soja disminuyó con el incremento de la biomasa relativa de altamisa (Cuadro 2.6). Esta reducción fue particularmente drástica cuando la alelopatía fue reducida por la aplicación del carbón y sin la aplicación del herbicida (Fig. 2.7 a). El modelo hiperbólico fue el que mejor se ajustó a la respuesta en los tratamientos con carbón y sin aplicación de herbicida ($p = 0,01$, $R^2_{\text{ajustado}} = 0,73$, Cuadro 2.6). Es decir, el rendimiento en grano se redujo ante aumentos en la biomasa de altamisa desde 266 a 535 g m^{-2} (0,34 y 0,69 de biomasa relativa, respectivamente, Cuadro 2.7) en el 2006, y desde 127 a 256 g m^{-2} (0,23 y 0,62 biomasa relativa, respectivamente, Cuadro 2.7) en el 2007. Con altas densidades de altamisa (8 plantas m^{-2}), se observaron pérdidas del rendimiento de soja del 33 % (0,67 RR) en el 2006 y el 17 % (0,83 RR) en el 2007. En contraste, sin carbón (alto nivel de alelopatía), el rendimiento en grano se mantuvo estable dentro del rango de densidades de altamisa exploradas, a pesar de que a altas densidades ($D4$), el tamaño de las plantas fue lo suficientemente grande como para generar competencia (Fig. 2.7, Cuadro 2.7).

Cuadro 2.6 Parámetros obtenidos del modelo hiperbólico (Ecuación 2) que describe la relación entre el RR de soja y la BR de altamisa en madurez fisiológica (R8) del cultivo en los tratamientos con carbón y sin herbicida. Los valores entre paréntesis denotan el error estándar; p_{modelo} es la probabilidad del modelo y g.l. los grados de libertad.

Tratamiento	Parámetros de regresión (\pm SE)			RMSE ¹	R^2_{ajustado}	p	g.l.
	a (g m ⁻²)	b (g m ⁻²)	c (g m ⁻²)				
RR	-0,77 (0,06)	1,07 (0,05)	-0,73 (0,04)	0,13	0,73	0,01	7

Modelo hiperbólico: $\hat{Y}_{ijk} = (a + b * X_{ij}) / (c * X_{ij})$, Ecuación 2.

¹RMSE: raíz del error cuadrático medio.

El rendimiento en grano fue mayor en el tratamiento *D2* (baja densidad de altamisa) que en los stands puros (*D1*) para todos los tratamientos de carbón y herbicida (e.g. en *C-* y *H-*, el rendimiento se incrementó hasta un 13 % en el año 2007), excepto para los tratamientos sin carbón y sin aplicación de herbicida en el 2006 (Cuadros 2.7 y 2.8). En el tratamiento con herbicida, el rendimiento de soja se mantuvo estable ante incrementos en la biomasa de altamisa (Fig. 2.7 b) y la biomasa de altamisa fue más baja con la aplicación de herbicida en ambos años (Fig. 2.6), sugiriendo que el nivel de competencia de altamisa sobre el cultivo de soja fue menor en los tratamientos *H+* que en los *H-* (ver Cuadros 2.7 y 2.8).

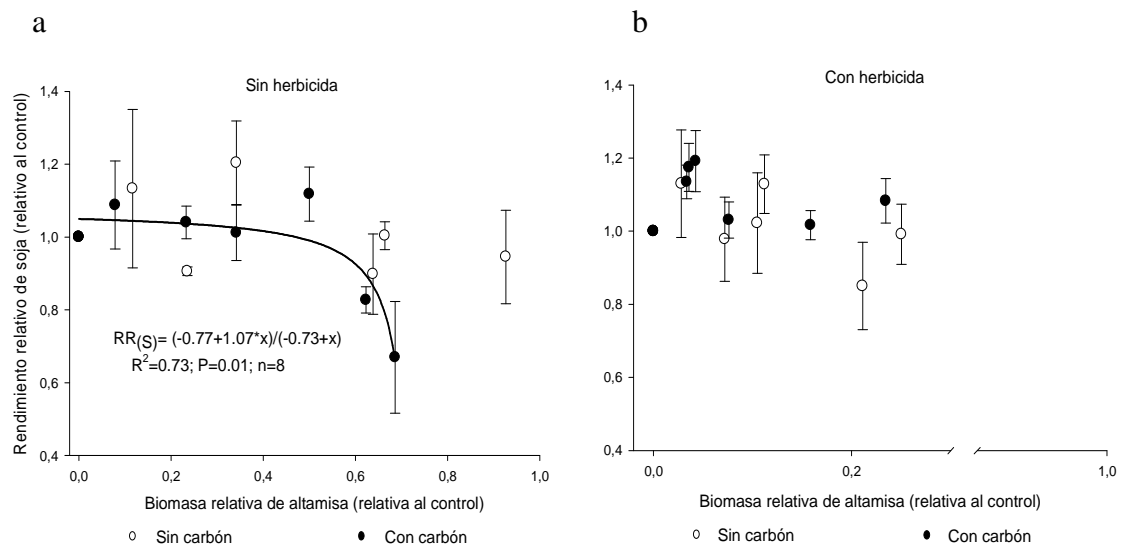


Figura 2.7 Rendimiento relativo de soja (RR, g m⁻²/g m⁻²) en función de la biomasa relativa de altamisa (BR, g m⁻²/g m⁻²) en R8 del cultivo, sin (símbolos vacíos) y con (símbolos llenos) carbón activado, sin aplicación de herbicida (a) y con aplicación (b) durante el 2006 y 2007. Los símbolos representan las medias de los tratamientos y las líneas verticales el error estándar de la media. En (a), la línea representa el modelo hiperbólico (Ec. 1). Rendimiento relativo de soja=1 representa el rendimiento en la parcela control de soja (*D1*): 306 y 317 g m⁻² en los tratamientos sin y con carbón en 2006 y 228 y 237 g m⁻² en 2007, respectivamente. La biomasa relativa de altamisa =1 representa la biomasa en las parcelas control de altamisa (*D5*): 746 y 779 g m⁻² en el tratamiento *C-* y *C+*, respectivamente en el 2006 y 525 y 544 g m⁻² para el 2007.

La biomasa de altamisa en los tratamientos sin y con carbón activado fue de 746 y 779 g m⁻² en el 2006, respectivamente y 525 y 544 g m⁻² para el 2007. En (b) el rendimiento de soja en *DI* fue 337 y 299 g m⁻² en 2006 y 252 y 223 g m⁻² en 2007 en los tratamientos sin y con carbón, respectivamente. La biomasa de altamisa en las parcelas control fue de 143 y 607 g m⁻² en 2006, y 577 y 143 g m⁻² en 2007, en los tratamientos sin y con carbón respectivamente.

Cuadro 2.7 Valores medios, errores estándares y valores relativos del rendimiento de soja y biomasa de altamisa a madurez en los tratamientos de carbón y sin aplicación de herbicida para el año 2006 y 2007.

Sin herbicida													
Año	Nivel de <i>D</i>	Sin carbón					Con carbón						
		Soja		Altamisa			Soja		Altamisa				
		Rendimiento (ES)		RR ^a	Biomasa (ES)	BR ^b	Rendimiento (ES)		RR ^a	Biomasa (ES)	BR ^b		
		(g m ⁻²)		(g m ⁻² /g m ⁻²)	(g m ⁻²)	(g m ⁻² /g m ⁻²)	(g m ⁻²)		(g m ⁻² /g m ⁻²)	(g m ⁻²)	(g m ⁻² /g m ⁻²)		
2006	<i>D1</i>	306,50 (13,43)		1,00	0	0	317,04 (34,41)		1,00	0	0		0
	<i>D2</i>	277,62 (3,64)		0,91	175,78 (56,64)	0,24	354,49 (23,54)		1,12	390,14 (239,00)	0,50		
	<i>D3</i>	289,76 (39,39)		0,95	691,55 (306,11)	0,93	320,77 (24,15)		1,01	266,69 (79,04)	0,34		
	<i>D4</i>	275,25 (33,91)		0,90	476,50 (119,25)	0,64	212,30 (7,56)		0,67	535,26 (6,39)	0,69		
	<i>D5</i>	0	0	0	746,22 (141,43)	1,00	0	0	0	779,89 (40,43)	1,00		
2007	<i>D1</i>	228,13 (17,39)		1,00	0	0	237,40 (2,53)		1,00	0	0		0
	<i>D2</i>	258,50 (9,38)		1,13	61,34 (24,70)	0,12	258,24 (28,69)		1,09	42,96 (14,40)	0,08		
	<i>D3</i>	274,67 (26,12)		1,20	179,52 (38,92)	0,34	246,93 (10,53)		1,04	127,02 (48,01)	0,23		
	<i>D4</i>	228,95 (8,67)		1,00	349,00 (160,37)	0,66	196,37 (8,55)		0,83	256,82 (160,32)	0,62		
	<i>D5</i>	0	0	0	525,33 (54,75)	1,00	0	0	0	544,60 (36,08)	1,00		

D, (soja/altamisa, plantas m⁻²); *D1*, 40/0 plantas m⁻²; *D2*, 40/2 plantas m⁻²; *D3*, 40/4 plantas m⁻²; *D4*, 40/8 plantas m⁻²; *D5*, 0/8 plantas m⁻².

^aRR, el rendimiento relativo de soja se calculó dividiendo el rendimiento obtenido en cada subparcela por el rendimiento control de cada tratamiento según el año.

^bBR, la biomasa relativa de altamisa se calculó dividiendo la biomasa obtenida en cada subparcela por la biomasa control de cada tratamiento según el año.

Cadro 2.8 Valores medios, errores estándares y valores relativos del rendimiento de soja y biomasa de altamisa a madurez en los tratamientos de carbón y con aplicación de herbicida para el año 2006 y 2007.

Con Herbicida													
Año	Nivel de D	Sin carbón						Con carbón					
		Soja			Altamisa			Soja			Altamisa		
		Rendimiento (ES)		RR ^a	Biomasa (ES)		BR ^b	Rendimiento (ES)		RR ^a	Biomasa (ES)		BR ^b
		(g m ⁻²)		(g m ⁻² /g m ⁻²)	(g m ⁻²)		(g m ⁻² /g m ⁻²)	(g m ⁻²)		(g m ⁻² /g m ⁻²)	(g m ⁻²)		(g m ⁻² /g m ⁻²)
2006	D1	337,09	(38,62)	1,00	0	0	0	299,24	(23,50)	1,00	0	0	0
	D2	346,30	(45,21)	1,13	4,02	(0,50)	0,03	347,87	(14,02)	1,13	4,82	(1,83)	0,03
	D3	299,73	(35,21)	0,98	10,31	(1,59)	0,07	315,81	(15,24)	1,03	10,91	(3,71)	0,08
	D4	260,50	(11,17)	0,85	30,36	(7,88)	0,21	311,57	(12,29)	1,02	22,75	(5,66)	0,16
	D5	0	0	0	143,30	(31,78)	1,00	0	0	0	607,44	(90,65)	1,00
2007	D1	252,49	(52,47)	1,00	0	0	0	233,60	(36,37)	1,00	0	0	0
	D2	285,00	(20,22)	1,13	64,73	(0,14)	0,11	274,41	(15,29)	1,17	21,81	(9,64)	0,03
	D3	258,09	(34,72)	1,02	60,54	(28,18)	0,10	278,37	(19,47)	1,19	25,87	(12,58)	0,04
	D4	250,33	(20,76)	0,99	144,48	(94,21)	0,25	252,99	(14,13)	1,08	142,37	(19,57)	0,23
	D5	0	0	0	577,60	(90,17)	1,00	0	0	0	143,49	(35,82)	1,00

D, (soja/altamisa, plantas m⁻²); D1, 40/0 plantas m⁻²; D2, 40/2 plantas m⁻²; D3, 40/4 plantas m⁻²; D4, 40/8 plantas m⁻²; D5, 0/8 plantas m⁻².

^aRR, el rendimiento relativo de soja se calculó dividiendo el rendimiento obtenido en cada subparcela por el rendimiento control de cada tratamiento según el año.

^bBR, la biomasa relativa de altamisa se calculó dividiendo la biomasa obtenida en cada subparcela por la biomasa control de cada tratamiento según el año.

2.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó el efecto de distintas prácticas agrícolas (herbicida y densidad) y de la acumulación de terpenos al medio edáfico por parte de *Artemisia annua* sobre la nodulación, el crecimiento y el rendimiento en el cultivo de soja. Los resultados mostraron que el incremento de la densidad de plantas de altamisa trajo aparejado una disminución en el rendimiento de soja. Sin embargo, no se observó una respuesta denso-dependiente en el rendimiento y el tamaño de los nódulos fue mayor, en presencia de los aleloquímicos provenientes de altamisa. Con la aplicación del herbicida, el rendimiento de soja para ambos tratamientos de carbón activado, permaneció estable ante incrementos en la biomasa de altamisa.

Estos resultados demuestran que cuando la alelopatía y la competencia actuaron simultáneamente (Inderjit y del Moral, 1997), el rendimiento de soja no se vio afectado por la presencia de altamisa en el rango de densidades cultivo-maleza estudiado, a pesar de que las plantas de altamisa a altas densidades (*D4*) fueron lo suficientemente grandes como para generar competencia. Por otra parte, cuando el cultivo de soja estuvo acompañado de altamisa en su máxima densidad y sin carbón, se observó un efecto positivo sobre el número de raíces de soja en 2007 y sobre la biomasa específica de nódulos en 2006. Este efecto positivo de altamisa, coincide con los resultados de Delabays *et al.* (2008), quienes reportaron un efecto de estimulación sobre el crecimiento radical en *Solanum tuberosum* L. cuando se incorporó al medio de cultivo lixiviados provenientes de altamisa.

Los tratamientos de densidad y herbicida impuestos en ambos experimentos, tuvieron por objetivo generar variabilidad en el grado de interferencia entre el cultivo y la maleza, resultando en un amplio rango de variación de la biomasa de altamisa. La metodología implementada en estos experimentos incluyó la manipulación de la densidad a través del agregado de plantas de altamisa en un cultivo de soja y la reducción del crecimiento de altamisa sin variaciones en la densidad mediante la aplicación de glifosato en dosis sub-letales. Sin embargo, no hubo diferencias entre tratamientos en la biomasa aérea de soja y el número y la biomasa de raíces de soja en el estado de floración (R1). Sólo en 2006 y con herbicida, donde la biomasa de altamisa en las mezclas fue drásticamente reducida, se produjo un incremento en la biomasa aérea de soja. Esta baja respuesta a los tratamientos fue encontrada también en estado de R8, en la madurez de soja, donde no se afectó la producción de biomasa de soja ante variaciones en la densidad y biomasa de altamisa.

Por otro lado, el rendimiento se redujo con la densidad de 8 plantas m⁻² de altamisa y la reducción de la biomasa de altamisa por efecto del glifosato produjo un apreciable incremento en el rendimiento de soja. En el 2006, hubo una interacción triple indicando que el rendimiento de soja no sólo fue afectado por la densidad o biomasa de altamisa y por el herbicida, sino también por los aleloquímicos presentes en el ambiente edáfico. En el nivel *D4* de densidad, el rendimiento en grano se redujo solo si el carbón fue aplicado en el suelo, sugiriendo que la interferencia de la maleza (*i.e.* competencia) se redujo cuando los aleloquímicos estaban presentes en el suelo. Estas aseveraciones son sustentadas sobre la base de dos años de experimentos realizados a campo, que incluyeron el uso del carbón activado con el objetivo de adsorber y reducir el pasaje de los aleloquímicos desde la parte aérea de altamisa hacia el suelo.

Los resultados obtenidos pueden tener distintas causas posibles, aquellas asociadas a la metodología implementada, *i.e.* efecto directo del carbón activado, o aquellas asociadas a la interacción entre los mecanismos de competencia y alelopatía.

En relación con la metodología implementada, es importante considerar que a pesar de que el carbón activado es considerado una herramienta efectiva para el estudio de la alelopatía en condiciones de campo (Inderjit y Callaway, 2003), existen trabajos previos que sugieren que el carbón activado interfiere con los efectos de la competencia y alelopatía. Por ejemplo se observó un incremento en la biomasa de las plantas de *Festuca campestris* Rydb., *Poa compressa* L. y *Bromus tectorum* L. incluso en ausencia de compuestos potencialmente alelopáticos (Lau *et al.*, 2008). Por el contrario, Wurst y Van Beersum (2009) encontraron un efecto negativo directo del carbón activado sobre el crecimiento, la nodulación y la floración de *Lotus corniculatus* L., especie leguminosa. Asimismo, trabajos realizados por Wurst *et al.* (2010) demuestran que la presencia de carbón activado afectó negativamente la biomasa radical en *Lupinus polyphyllus* Lindl. y la biomasa aérea y radical de *Plantago lanceolata* L., siendo que ambos efectos estuvieron presentes en ausencia de otras especies competidoras. Por el contrario, en los experimentos que se describen en este capítulo se comprobó experimentalmente que el uso de una capa fina de carbón activado es una herramienta efectiva para capturar los aleloquímicos provenientes de la maleza sin un efecto directo cuantificable sobre el crecimiento del cultivo o la maleza. Esta aseveración surge luego de evaluar que la cantidad de carbón utilizada y su forma de aplicación no afectaron directamente la biomasa y rendimiento del cultivo de soja y la biomasa de altamisa en ambos periodos ontogénicos (R1 y R8). Estos resultados sugieren que las diferencias encontradas entre los tratamientos de carbón estuvieron relacionadas a la presencia de los aleloquímicos en el suelo y no directamente a la presencia o fitotoxicidad del carbón activado.

Las diferencias encontradas entre estos trabajos y el presente estudio, podrían estar relacionadas a la escala de observación (planta *vs* cultivo), a la cantidad de carbón activado utilizado (10 g maceta⁻¹ *vs* 500 g m⁻²), a la forma de aplicación (mezcla del carbón activado con la tierra *vs* aplicación subsuperficial de una capa fina de carbón) y la interacción carbón-raíces (contacto de las raíces en toda la matriz del suelo *vs* baja o nula interacción del carbón con las raíces).

El RR de soja mostró una relación densodependiente a la BR de altamisa (densidad de maleza) observándose una respuesta hiperbólica cuando la alelopatía se redujo (con carbón activado). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por diferentes autores (Oreja y Gonzalez-Andújar, 2007; Ryan *et al.*, 2009) quienes demuestran que el modelo hiperbólico es uno de los mas adecuados para describir la pérdida de rendimiento en experimentos aditivos. Sin embargo, otros experimentos conducidos en maceta demuestran que la biomasa de soja disminuye a medida que se incrementa la dosis de residuos de hoja de *A. annua* en el suelo, siguiendo un modelo exponencial (Lydon *et al.*, 1997). Del mismo modo, el crecimiento de especies leguminosas (*i.e.* capiquí y poroto) se redujo ante el incremento de residuos provenientes de *Chenopodium murale* (Batish *et al.*, 2007). Estos trabajos demuestran la ocurrencia de la alelopatía como una mecanismo de interacción bajo condiciones controladas, pero estas respuestas pueden variar en condiciones menos controladas y en sistemas complejos como los agroecosistemas (Ridenour y Callaway, 2001).

Por lo expuesto, la estabilidad del rendimiento de soja, involucraría interacciones positivas e indirectas entre los aleloquímicos de altamisa y los microorganismos del suelo, como *B. japonicum*, generando en ocasiones cambios positivos en la nodulación de soja. De esta manera, los efectos positivos y negativos pueden ocurrir simultáneamente cuando las especies interactúan (Callaway, 1994) y el efecto neto de una especie sobre la otra puede ser el resultado de ambos efectos

(Callaway, 1995). El efecto directo de la alelopatía sobre nutrición de la planta a través de la nodulación (*i.e.* peso de nódulos o la fijación), podría ser tan importante como los efectos indirectos sobre el ciclo del nitrógeno a través del efecto de los aleloquímicos en el ambiente edáfico donde crecen los microorganismos (Blanco, 2007). Estas consecuencias podrían ser mucho más diversas que las asumidas previamente, ya que involucrarían la existencia de efectos de estimulación en condiciones regulares a campo. Mas allá de esto, el balance entre los efectos de estimulación y de inhibición dependerán de la densidad de ambas especies y de la concentración de aleloquímicos en el suelo (Sinkkonen, 2001). Por lo expuesto, la estabilidad en el rendimiento de la soja a medida que se incrementa la densidad de altamisa podría deberse, principalmente, a un efecto indirecto de mayor disponibilidad de N fijado simbióticamente en presencia de aleloquímicos. Esto puede asumirse, por un lado, a partir de la mayor relación positiva hallada entre la biomasa y el número de nódulos en presencia de los aleloquímicos para ambos años, y por el otro, a la mayor biomasa específica de los nódulos en los tratamientos sin carbón en el 2006 o al mayor número de nódulos en el 2007.

La mayor biomasa específica de nódulos estuvo asociada con nódulos localizados en las raíces primarias, los cuales generalmente fijan más nitrógeno (Toniutti *et al.*, 2004). En 2007, el mayor número de raíces en *D4* contribuyó a incrementar la biomasa de nódulos en las parcelas sin carbón (750 g m^{-3}) en relación a los tratamientos de carbón (287 g m^{-3}). Estos resultados se contraponen con estudios previos que demuestran una reducción tanto del crecimiento como de la nodulación cuando se incorporan al suelo aleloquímicos provenientes de los residuos de plantas (Wardle *et al.*, 1994; Batish *et al.*, 2007). Las diferencias encontradas entre el presente estudio y los trabajos mencionados, podrían deberse al tipo de aleloquímicos involucrados (terpenoides *vs* ácidos fenólicos), la fuente de aleloquímicos (lixiviación de las plantas *vs* residuos incorporados al suelo) o los procesos de nodulación evaluados (peso de nódulos *vs* contenido de leghemoglobina). Por lo tanto, la mera presencia de los aleloquímicos en la planta no es suficiente evidencia de la interacción directa cultivo-maleza alelopática. Estas respuestas en el crecimiento y la nodulación observados podrían deberse a la influencia de estos compuestos en los procesos ecológicos del suelo más que al efecto directo sobre las plantas receptoras (Inderjit y Weiner, 2001). Por otro lado, el agregado de material vegetal al suelo puede afectar la movilización de nutrientes (Inderjit, 2005), el pH y el potencial osmótico del suelo (Wardle *et al.*, 1992), y la actividad microbiana (Kaur *et al.*, 2009).

Es destacable que cuando se aplicó una dosis subletal de herbicida, imitando la deriva en condiciones de campo, el rendimiento relativo de soja permaneció estable a medida que se incrementó la biomasa relativa de altamisa, pero a altas densidades de la maleza (*D4*), el rendimiento relativo (RR) de soja tendió a decrecer en los tratamientos sin carbón (el rendimiento se redujo en un 15 %, en 2006). Estos resultados sugieren que el efecto positivo de los aleloquímicos sobre la nodulación fue anulado por el efecto del herbicida, disminuyendo el RR de soja (a alta BR de altamisa). Esto hace suponer que el herbicida reduce la producción de aleloquímicos de altamisa o que afecta directamente la fijación biológica. Trabajos previos que encontraron efectos negativos de glifosato sobre las bacterias fijadoras (*B. japonicum*) apoyarían esta última idea (Zablotowicz y Reddy, 2004).

Existen diferentes trabajos que estudian las interferencias entre un cultivo y sus malezas, entre ellas altamisa (Lydon *et al.*, 1997) y otras especies alelopáticas (Batish *et al.*, 2007) bajo condiciones de laboratorio o en invernáculo (Inderjit *et al.*, 2001; Inderjit y Nilssen, 2003). Sin embargo, pocos estudios han investigado la importancia relativa

de la competencia y la alelopatía bajo condiciones de campo (Nilsson, 1994; Inderjit *et al.*, 2001) donde una o ambas interferencias competitivas y alelopáticas podrían enmascarar el efecto de la otra. En base a este conocimiento, este es el primer trabajo que muestra el efecto de una maleza alelopática como altamisa coexistiendo con un cultivo de soja y expuesto a variaciones espacio-temporales de la biomasa de la maleza y a dosis subletales de glifosato. El presente estudio evidencia que el uso de experimentos aditivos y de carbón activado con objeto de manipular el efecto químico de la maleza con una aproximación agroecológica fue una herramienta efectiva para estudiar la competencia y la alelopatía. Las variaciones bióticas y abióticas del suelo condicionan los efectos químicos del mismo, y pueden actuar tanto de “buffer” como de catalizador de los procesos químicos (Inderjit y Callaway, 2003). Por lo tanto, los procesos físicos, químicos y biológicos del ambiente del suelo, interactúan con los aleloquímicos del medio edáfico (Inderjit *et al.*, 2001) y producen los efectos contrastantes sobre la nodulación del cultivo y su respuesta en el RR de soja.

En el presente capítulo se estudió la respuesta del cultivo de soja medida a través del crecimiento, nodulación y rendimiento cuando crece en combinación con densidades crecientes de la maleza alelopática, altamisa, y ante el agregado del herbicida glifosato al ambiente. Cabe preguntarse de que manera la densidad y la dosis subletal de glifosato afectó la producción de estos compuestos alelopáticos volátiles y no volátiles en la maleza y su acumulación en el suelo. Por consiguiente, en el próximo capítulo se estudiarán tanto la producción como la calidad (composición) de los compuestos alelopáticos de altamisa y su acumulación en el suelo y el impacto de estos aleloquímicos en el cultivo.

2.5 CONCLUSIONES

Los resultados del presente capítulo permiten extraer las siguientes conclusiones:

El incremento de la densidad de altamisa dentro del rango estudiado no reduce la biomasa aérea del cultivo en R1, pero sí modifica el número de nódulos y el rendimiento en grano de la soja dependiendo del tratamiento de carbón o herbicida.

El RR de soja disminuyó a medida que se incrementó la BR de la maleza. Esta reducción fue particularmente drástica cuando se redujo la alelopatía, a través de la aplicación del carbón activado, y sin la aplicación del herbicida. Por el contrario, sin el agregado del carbón activado (en presencia de aleloquímicos de altamisa en el suelo) el rendimiento de soja permaneció estable dentro del rango de densidades exploradas, a pesar de que la biomasa de la maleza a altas densidades (D4) fue lo suficientemente grande para generar competencia con el cultivo.

La falta de respuesta ante el incremento de la densidad de altamisa podría estar relacionada con un efecto indirecto de los aleloquímicos interactuando con los microorganismos del suelo (*i.e.* *B. japonicum*) y que afectan positivamente la nodulación (la biomasa específica de nódulos fue mayor en el 2006 y a altas densidades, se incrementó la biomasa de nódulos al aumentar el número de raíces en el año 2007).

En resumen, los resultados de capítulo proveen por un lado, una sólida evidencia del efecto alelopático positivo y el de competencia generados entre altamisa y el cultivo de soja en condiciones de campo, y por otro lado, la aplicación del herbicida glifosato y en dosis subletales, podría eliminar este efecto.

CAPITULO 3

Aleloquímicos de altamisa y su relación con la producción de la soja*

*Parte del contenido de este capítulo fue publicado en de la Fuente E.B., Gil A., Suárez S.A., Morvillo C.M. y Oreja F.H. 2011. Interacciones entre el cultivo de soja y los organismos que lo acompañan: Efectos del manejo. 143-148 pp En: Correa O.S., de la Fuente E.B., Carmona M.A., Kantolic A.M. y Lavado R.S. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. ISBN 978-950-29-1334-6.

3.1 INTRODUCCION

Las plantas del género *Artemisia* tienen un sabor y aroma característico, y poseen propiedades botánicas y farmacéuticas de interés (Kordali *et al.*, 2006). La altamisa (*Artemisia annua*), es por una parte considerada una maleza en varios países, e.g. Bulgaria, Rumania, Turquía, Argentina, Italia, Francia y España, no solo por su interacción competitiva sino que además por su acción contaminante de cosechas y forrajes ya que, por ejemplo, le confiere un sabor característico a la leche de los animales tambo que la ingieren. Por otra parte, dado su valor medicinal e industrial se la cultiva en Hungría, Yugoslavia y China (Klayman, 1993), y ha sido introducida experimentalmente en India (Singh *et al.*, 1988), Tailandia, Malasia, USA, Brasil, Suiza y Finlandia (Laughlin *et al.*, 2002). El interés medicinal de altamisa se debe a la presencia del metabolito secundario no volátil, *artemisinina*, (endoperóxido sesquiterpeno lactona) (Fig. 3.1) con actividad antimalárica (Meshnick *et al.*, 1996) y anti cancerígena (Singh *et al.*, 2001), relacionadas al grupo peróxido del sesquiterpeno lactona. *A. annua*, es también cultivada industrialmente por su aceite esencial, (compuestos volátiles, en su mayoría, mono y sesquiterpenos), que se utilizan en la perfumería, cosmética y aromaterapia (Malik *et al.*, 2012). Asimismo, estos metabolitos tienen propiedades antimicóticas (Shuhua *et al.*, 2002) y antimicrobianas (Verdian-rizi *et al.*, 2008).

Existe una amplia variabilidad en el contenido y composición del aceite esencial de altamisa, provenientes de hojas e inflorescencias, según el genotipo, el origen geográfico de procedencia y el estado ontogénico de las plantas (Verma *et al.*, 2011; Lenardis *et al.*, 2011). La concentración (% , relación volumen/peso) puede variar entre 0,04 a 1,9 % (Bagchi *et al.*, 2003) y la composición entre 36 (Tzenkova *et al.*, 2010) y 113 compuestos (Cavar *et al.*, 2012). De Magalhães *et al.* (2004) identificaron como componentes mayoritarios de la esencia al 1,8 cineol y el alcanfor, Brown (2010) destaca a la artemisia cetona y al germacreno D y Ma *et al.* (2007) al borneol, (Z)- β -farnaseno y al germacreno D (Fig. 3.1).

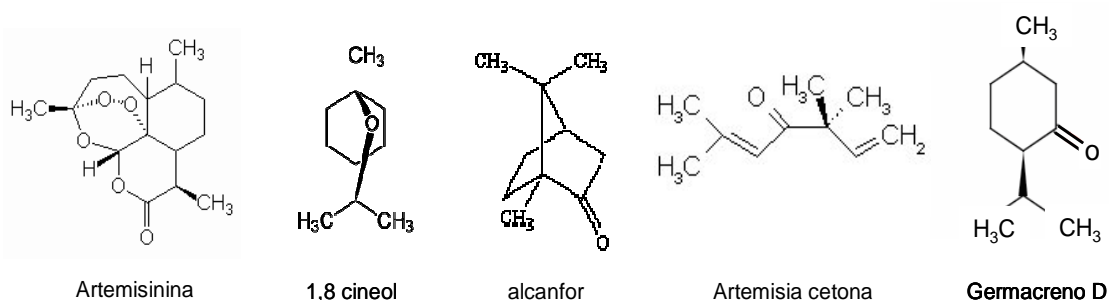


Figura 3.1 Estructura molecular de la artemisinina (sesquiterpeno lactona, no volátil) y de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de altamisa: 1,8 cineol, alcanfor, artemisia cetona y germacreno D.

Al igual que el aceite esencial, el contenido de artemisinina (compuesto no volátil, Fig. 3.1) varía en función del genotipo (Ferreira *et al.*, 2005), del ambiente y del estado ontogénico de la planta (Gupta *et al.*, 2002). El porcentaje de este compuesto en la biomasa aérea de plantas en floración oscila entre 0,01 y 1 % (Gupta *et al.*, 2002, Kumar *et al.*, 2004) o 1,4 % (Delabays *et al.*, 2001), acumulándose cerca del 89 % del total de la artemisinina en las hojas e inflorescencias (Ferreira y Janick, 1995) y siendo

muy baja (8%, Gupta *et al.*, 2002) o nula (Charles *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 2004) su cantidad en las raíces y baja cantidad en las ramas (Ferreira *et al.*, 1995).

La liberación y lixiviación de los aleloquímicos hacia el suelo provienen no solo de las plantas vivas sino además de los órganos caídos (*e.g.* hojas, tallos, flores) luego de completar su ciclo de vida (Rice, 1984). Existen factores del ambiente (*e.g.* viento y las precipitaciones) y de estrés (biótico y abiótico), que actúan aumentando la síntesis y la lixiviación de aleloquímicos provenientes de los órganos aéreos (Inderjit *et al.*, 2005).

Los factores de estrés biótico (*e.g.* densidad) y abiótico (*e.g.* herbicida) (De Moraes *et al.*, 2004), pueden incrementar la producción de los aleloquímicos en la planta, como así también su liberación al ambiente. Altamisa, al igual que otras plantas, posee la capacidad de desprender sus hojas basales cuando se encuentra creciendo a alta densidad (competencia intraespecífica) o compitiendo con otras especies vegetales como la soja (competencia interespecífica) (observación personal). Estudios del efecto inhibitorio de los aleloquímicos sobre el crecimiento de las plantas de soja, muestran que el crecimiento y el rendimiento son afectados cuando se incorporan al suelo, hojas e inflorescencias provenientes de altamisa (Lydon *et al.*, 1997). Asimismo se ha demostrado que estos efectos se magnifican cuando se produce la acción conjunta de la artemisinina con otros metabolitos secundarios provenientes de las hojas de altamisa (Lydon *et al.*, 1997), en comparación a ensayos donde se evalúan los compuestos por separado (Delabays *et al.*, 2008).

En un cultivo, es de esperar que ante un mayor número de plantas de malezas por unidad de superficie se incremente la competencia interespecífica (Frappell, 1979). Cambios en el ambiente físico de las plantas generados por el estrés, frecuentemente tienen un efecto marcado sobre la asignación de recursos a los diferentes destinos (Waring y Pitman, 1985; Lambers *et al.*, 1988). Herms y Mattson (1992) postularon que ante restricciones de recursos, la tasa de crecimiento resulta más afectada que la tasa de fotosíntesis, en consecuencia el excedente de fotoasimilados promueve el incremento en la producción de metabolitos secundarios (*i.e.* aceite esencial y artemisinina). Por lo cual la concentración y la composición de estos compuestos podrían verse afectadas (Gershenzon y Croteau, 1991).

El glifosato, el herbicida más ampliamente utilizado para el control de malezas (Duke y Powles, 2009) en soja transgénica, es generalmente considerado un agroquímico con bajo impacto ambiental. Muchos de los estudios sobre el efecto del glifosato sobre la comunidad de microorganismos del suelo demuestran no tener efecto alguno (Santos y Flores, 1995; Weaver *et al.*, 2007), sin embargo, otros estudios demuestran que las aplicaciones de este herbicida pueden reducir (Eberbach y Douglas, 1989) o promover la nodulación o la formación de micorrizas (Weidenhamer y Callaway, 2010) según las dosis y las especies testeadas. La deriva de herbicidas, ya sea en zonas tratadas o no tratadas, pueden afectar el crecimiento de las plantas susceptibles y de esta manera, actuar incrementado significativamente la producción de metabolitos secundarios en los tejidos cuando las plantas son expuestas a bajas dosis de herbicida. Por ejemplo, dosis subletales de herbicidas, diclorometil (Vila-Aiub y Ghersa, 2005) y glifosato (Weidenhamer y Callaway, 2010), pueden aumentar la producción de aleloquímicos en la planta. De esta manera, los aleloquímicos liberados por las malezas juegan un rol importante en la química del suelo, afectando las interacciones cultivo-maleza (Delabays *et al.*, 2008) y cultivo-microorganismo (*B. japonicum*) (Rice y Pancholy, 1974).

A pesar de que la biosíntesis de metabolitos secundarios (artemisinina, componentes del aceite esencial), ha sido ampliamente caracterizada en las últimas dos

décadas, su regulación y acumulación en las plantas ante eventos de estrés continúan siendo pobremente estudiados (Singh *et al.*, 2009; Marchese *et al.*, 2010).

Los objetivos de este capítulo son evaluar el efecto de la densidad de plantas de altamisa y de dosis subletales de herbicida sobre (i) el crecimiento de la biomasa de hojas e inflorescencias de altamisa (ii) la producción y acumulación de los aleloquímicos (aceite esencial y artemisinina) en la biomasa de hojas e inflorescencias de altamisa (iii) la composición del aceite esencial y (iv) la acumulación de artemisinina en el medio edáfico y su relación con la producción de soja.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos se utilizaron los experimentos en condiciones de campo (Exp. 1 y 2) descriptos previamente en el capítulo 2.

3.2.1 Determinaciones de biomasa

En la floración del cultivo de soja (R1, Fehr y Caviness, 1977) se determinó el peso específico de los nódulos y en madurez fisiológica de soja (R8, Fehr y Caviness, 1977), se determinó el rendimiento en grano (peso). Ambas metodologías de determinación se detallaron en el capítulo 2.

Paralelamente en R8 de soja, se cosecharon 5 plantas de altamisa en cada unidad experimental. Este momento de cosecha de las plantas de altamisa se decidió considerando por un lado el momento del máximo peso de grano de la soja y por el otro, el momento óptimo (tamaño y ontogenia: floración) para la determinación del aceite esencial de la biomasa aérea de la maleza. La parte aérea de las plantas de altamisa se cortó a dos centímetros del suelo y se separaron las hojas e inflorescencias de los tallos. Posteriormente, el material verde fresco de hojas e inflorescencias de cada unidad experimental se pesó. Una submuestra del conjunto de hojas e inflorescencias y el total de tallos se secó en forma separada en estufa a 68 °C hasta constancia de peso para determinar la biomasa de hojas e inflorescencias (H e I).

La biomasa de H e I se conservó en el freezer (-12 °C) hasta el momento de la determinación de la composición del aceite esencial. A fin de determinar el % de artemisinina en las hojas (μ /100 g muestra) de altamisa, se tomó una fracción de cada muestra y se secó a 35 °C hasta constancia de peso y fueron enviadas (200 g de biomasa base seca) al laboratorio MEDIPLANT, Suiza, para su determinación mediante la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC) según la metodología descrita por Gaudin y Simonnet (2002).

3.2.2 Determinación del aceite esencial de la biomasa de altamisa

A fin de determinar la producción (ml) de aceite esencial de altamisa se hidrodestiló la biomasa de H e I conservadas en freezer (200 g peso fresco) durante una hora, utilizando trampas tipo Clevenger (Clevenger, 1928) de acuerdo a la metodología descrita en la Farmacopea Europea (1997). El aceite esencial se recogió en las trampas, sobre benceno calidad cromatográfica (relación biomasa destilada:benceno=1: 0,01 a fin de homogeneizar el nivel de dilución). Luego se eliminaron las trazas de agua en las muestras con el agregado de sulfato de sodio anhidro y posteriormente, se guardó el

aceite esencial destilado de cada unidad experimental en frascos color caramelo, y se conservó en freezer -8 °C hasta el momento de su análisis cromatográfico.

3.2.3 Determinación de la composición del aceite esencial

Metodología de análisis

El análisis cuali-cuantitativo del aceite esencial se realizó en la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) por medio de cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (GC-FID-MS), en un equipo Perkin Elmer GC modelo Clarus.

Las condiciones analíticas empleadas para el análisis cuali-cuantitativo del aceite esencial por CG-FID-MS fueron: fase móvil: helio a 1,87 ml/min; inyector tipo *split/splitless* (Relación de splits= 1:100) conectado con un divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido (una polar y otra no polar); programación de temperatura: 90 °C, luego a 3 °C/min hasta los 225 °C (15 min), temperaturas de inyector y detectores FID: 255 °C y 275 °C, respectivamente; temperatura de la línea de transferencia: 180 °C; temperatura de la fuente de iones: 150 °C; tiempo final de corrida: 70 min; rango de masas escaneado: 40-400 *m/z*.; cantidad inyectada: 0,2 µl de una dilución al 10 % en hexano.

Identificación y cuantificación de los compuestos

La identificación de los componentes del aceite esencial fue realizada por comparación de sus espectros de masa con los que figuran en bases de datos computarizadas (Adams, 2007; Wiley/NIST Mass Spectral Library, 2008; estándares propios), y por comparación de sus índices de retención, obtenidos en las dos columnas empleadas respecto de una serie homóloga de alcanos (C₆-C₂₄), con los obtenidos con estándares propios y con los que figuran en bibliografía.

La composición porcentual de cada compuesto fue determinada por el método de porcentaje de áreas, considerando que el factor de respuesta para todos los componentes es igual a 1. Para cada componente fue tomada la menor respuesta obtenida entre las correspondientes a cada columna utilizada.

3.2.4 Análisis del aleloquímico artemisinina en el carbón activado

Los estudios del efecto de los aleloquímicos sobre el crecimiento de los cultivos involucra tanto el agregado directo de los aleloquímicos al medio edáfico o de cultivo (Rifflé *et al.*, 1990) o indirecto a través de fuentes de aleloquímicos (*i.e.* hojas) (Bhowmik y Doll, 1982; Batish *et al.*, 2007; Batlang y Shushu, 2007), como su eliminación a través de la aplicación de un adsorbente (Nilsson, 1994) en plantas alelopáticas creciendo con el cultivo. Para este último propósito es frecuente el uso del carbón activado (C), como adsorbente de compuestos orgánicos en experimentos de ecología, con el fin de dilucidar el rol de los compuestos alelopáticos en relación a la competencia interespecífica (Nilsson, 1994; Wurst *et al.*, 2010). Si bien esta técnica se ha utilizado para observar la respuesta diferencial de las plantas a la presencia de metabolitos secundarios, son pocos los trabajos en los cuales se cuantifican estos compuestos adsorbidos en el carbón activado y por lo tanto, el nivel de los aleloquímicos reponsables de la variación de la respuesta en el cultivo.

Con el fin de cuantificar el nivel de artemisinina en el carbón activado, se tomaron muestras compuestas del adsorbente enterrado sub-superficialmente provenientes de 5 sitios al azar dentro de cada unidad experimental en madurez de soja (R8, Fehr y Caviness, 1977). Posteriormente a la recolección de cada muestra compuesta, se limpió la espátula con etanol a fin de evitar contaminación cruzada entre los tratamientos. Las muestras se conservaron en frascos y se almacenaron en freezer (-8 °C) hasta su análisis.

Dado que la técnica de desorción de artemisinina del carbón activado no fue encontrada en la literatura, se desarrolló un método de adsorción/desorción de esta molécula a fin de cuantificar el % de artemisinina adsorbido en el carbón activado de las parcelas. El método se desarrolló en el Laboratorio del SCAI (Servicio Central de Apoyo a la Investigación) en la Universidad de Córdoba en España en conjunto con el Dr. Fernando Lafont y su equipo de investigación. Se tuvieron en cuenta para su desarrollo las consideraciones realizadas por Blair *et al.* (2009) (*i.e.* blancos, eficiencia de recuperación del aleloquímico, entre otros). A continuación se describe dicha técnica.

Técnica de adsorción/desorción de artemisinina en el carbón activado

Preparación del patrón de artemisinina

El patrón de artemisinina se preparó utilizando una solución estándar de artemisinina disolviendo 2,64 mg de artemisinina (Sigma-Aldrich, 98 %) en 100 ml de acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$). Posteriormente, con una pipeta se capturó 189 μl de la solución anterior con el agregado de 50 ml de diclorometano (CH_2Cl_2).

Cuantificación de la adsorción/desorción de artemisinina

En un vaso de precipitado se pesó 1 g de carbón activado puro de igual procedencia al utilizado en las parcelas experimentales y se agregó 1 ml del patrón de artemisinina. Posteriormente, se utilizaron 25 ml de diclorometano como solvente para desorber la artemisinina del carbón activado. Las muestras se colocaron en un sonicador durante 15 minutos y luego se las centrifugó a 40 rpm x 100 durante 5 minutos. La fracción líquida se trasvasó a un matraz realizando previamente el filtrado a través de un embudo y lana de vidrio. Para evaporar el solvente se utilizó el rotovapor. Finalmente, el extracto seco del matraz fue recuperado con 1 ml de acetonitrilo y recolectado con un filtro de jeringa hacia un tubo de Eppendorf. Posteriormente, las muestras se conservaron en heladera (10 °C) hasta su análisis mediante HPLC. Sobre la base del volumen de artemisinina aplicado en el carbón activado y su recuperación posterior, se calculó el % de recuperación como:

$$\mu = ((C_o - C_f)/C_o) \times 100 \% \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde μ (%) es la eficiencia de desorción o recuperación, C_o (ml/g), es la concentración de artemisinina inicial y C_f (ml/g), es la concentración de artemisinina desorbida del carbón activado.

Procesamiento de las muestras de carbón activado

Las muestras se procesaron colocando 2 g de carbón activado por muestra en vasos de precipitados en los cuales se adicionaron posteriormente 10 ml de diclorometano. Cada muestra se sonicó durante 15 minutos y luego se agitó a máxima

velocidad (80 rpm) durante otros 15 minutos. A continuación la solución se transvasó a tubos de ensayo y se colocó en una centrífuga con el fin de separar la fase líquida (solvente) de la sólida (carbón activado). Posteriormente, cada muestra se filtró para luego destilar el solvente a través de un rotovapor (40 °C). El extracto seco del matraz fue recuperado con 1 ml de acetonitrilo y recolectado con un filtro de jeringa hacia un tubo de Eppendorf. Las muestras se conservaron en heladera (10 °C) hasta su análisis mediante HPLC.

3.2.5 *Análisis de los datos*

La producción y concentración de aceite esencial y de artemisinina se analizaron a través de un ANVA mediante el programa ESTADISTICA versión 7 (StatSoft, Inc., 2004). Los datos de concentración de aceite esencial por su naturaleza, se transformaron aplicando la función de raíz cuadrada de x , al no cumplirse con uno de los supuestos del ANVA (homogeneidad de varianza), mientras que se aplicó una función logarítmica al resto de las variables analizadas en el caso de no cumplirse con este supuesto.

Los datos de producción de aceite esencial (ml) por superficie fueron analizados a través de un ANCOVA (Koricheva, 1999). Debido a la existencia de colinealidad entre las variables producción de aceite esencial y la biomasa de altamisa, la biomasa aérea de H e I de altamisa (BA) se asignó como variable continua (covariable) en el análisis.

Dado que no hubo efecto del carbón activado sobre el crecimiento de las plantas ($p=0,37$ y $p=0,36$ para el 2006 y 2007, respectivamente), ni sobre la producción ($p=0,35$ para el 2006 y $0,52$ para el 2007) y concentración de aceite esencial ($p=0,22$ en el 2006 y $p=0,98$ en el 2007), se analizaron los factores de densidad y herbicida sin discriminar la presencia o ausencia de carbón activado utilizando todos los datos.

Para representar e interpretar simultáneamente los cambios en la producción (ml) y concentración (% vol/peso expresado sobre base seca) del aceite esencial y la biomasa aérea de altamisa en respuesta a los tratamientos, se utilizó el análisis vectorial gráfico (GVA, Koricheva, 1999; Veteli *et al.*, 2007). El GVA se representa tridimensionalmente mediante tres ejes: concentración (%) de los terpenos (Eje Y); producción (ml) de terpenos (Eje X) y biomasa aérea total por planta (Eje Z, que corresponde a la línea diagonal) (Fig. 3.2), utilizándose los valores relativos con respecto a cada tratamiento control (1.1.1).

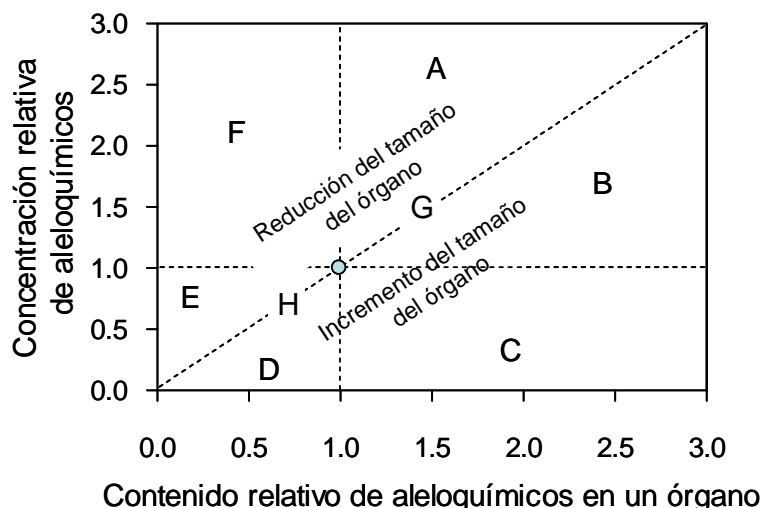


Figura 3.2 Interpretación de los cambios en la concentración relativa y el contenido relativo de aleloquímicos y el peso relativo del órgano (*i.e.* hoja o planta), (Adaptado de Koricheva, 1999 y Veteli *et al.*, 2007). La línea punteada oblicua representan los valores de la biomasa relativa=1, las líneas punteadas perpendiculares esquematizan el contenido relativo de aceite esencial=1 (vertical) y la concentración relativa de aceite esencial=1 (horizontal). El círculo central representa el punto de referencia (Control: 1, 1, 1).

La finalidad que persigue este análisis es evaluar el efecto de los tratamientos sobre el cambio relativo del tamaño de planta y además como se afecta la producción de terpenos, surgiendo ocho posibilidades: Incremento relativo de la síntesis de terpenos y disminución (A) o incremento (B) del peso específico del órgano (*i.e.* g m^{-2}); disminución de la síntesis relativa de terpenos y disminución (C) o incremento del peso específico del órgano (D); sin cambios en la síntesis relativa de terpenos y también disminución (E) o incremento (F) del peso específico y finalmente, incremento (G) o disminución (H) en la síntesis, pero sin cambios en el peso específico de la planta. (Fig. 3.2). La dirección de la resultante vectorial, podría explicar si los cambios en altamisa estuvieron asociados a cambios en el peso total de la planta, al contenido de terpenos o a ambas combinaciones dado los diferentes tratamientos de densidad y herbicida (Koricheva, 1999).

Los datos de composición del aceite esencial de altamisa obtenidos para cada año se analizaron mediante el análisis de correspondencia canónica (ACC). El ACC construye combinaciones lineales (ejes) de las variables explicatorias a lo largo de las cuales se ordenan los componentes del aceite esencial (Jongman *et al.*, 1995). Los objetivos de este análisis fueron, determinar la relación existente entre la composición de la esencia y la biomasa de altamisa, la producción (ml) y concentración (%) de aceite esencial que variaron con la competencia (dado por un aumento en la densidad de plantas de altamisa) y/o con la aplicación de glifosato en dosis subletales (fuente de estrés). Por ello, se utilizaron dos matrices para su análisis: la composición de la esencia (variables respuesta) como matriz principal y los datos de biomasa de altamisa, producción y concentración de aceite esencial como matriz secundaria (también llamadas, variables explicatorias). El programa estadístico utilizado para dicho análisis fue el PC-ORD versión 2 (Mc Cune y Mefford, 1995). El ACC permitió ordenar los tratamientos en un espacio multidimensional definido por la composición de la esencia, bajo la restricción de que los principales sentidos de variación sean aquellos mejor

correlacionados con las propiedades ambientales resumidas en la matriz secundaria (ter Braak, 1987). Las principales variables explicatorias se representaron gráficamente mediante “biplots”, basados en las funciones canónicas que describen cada eje. La dirección del vector indica la asociación con los ejes.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Biomasa de H e I, producción y concentración de aceite esencial

En el 2006 hubo una interacción significativa de la densidad y el herbicida para la biomasa de H e I por superficie y por planta ($p < 0,01$ en ambas variables, Cuadro 3.1). En ausencia de herbicida, la biomasa varió desde 212 (*D2*) a 475 g m⁻² (*D5*), sin embargo, el incremento de número de plantas de altamisa (*D2*, *D3* y *D4*) no se tradujo en incrementos significativos de la biomasa aérea de H e I por superficie (Fig 3.3 a) ni en disminuciones de la biomasa por planta (Fig.3.3 c) inclusive en ausencia de competencia interespecífica (*D5*). En cambio, a bajas densidades (*D2* y *D3*), la biomasa de altamisa de H e I por m² se redujo considerablemente de 212 a 2,89 g m⁻² en *D2* y de 351 a 5,33 g m⁻² en *D3* cuando se aplicó herbicida (Fig. 3.3 a). Con respecto a la biomasa de H e I por planta de altamisa, en ausencia de herbicida (*H-*) y a bajas densidades (*D2* y *D3*) y en la monocultura de altamisa (*D5*), el tamaño de las plantas fue 10 veces mayor con respecto a las plantas que fueron expuestas al herbicida (Fig. 3.3 a).

En el 2007, no se encontró un efecto de interacción significativo entre la densidad y el herbicida en la biomasa de H e I por superficie y planta ($p = 0,35$ y $p = 0,30$, respectivamente. Cuadro 3.1). Analizando los factores por separado, se observó que la densidad produjo cambios en estas biomásas ($p < 0,001$; para ambas variables, Cuadro 3.1). El aumento de la densidad de altamisa en plantas creciendo con la soja, trajo aparejado un aumento significativo de la biomasa de H e I de altamisa variando desde 13 a 65 g m⁻². Los mayores valores de esta biomasa por superficie se observaron en la monocultura de altamisa (*D5*, 180 g m⁻², Cuadro 3.2). En cambio por planta, la biomasa de altamisa difirió significativamente entre las parcelas con soja (*D2*, *D3* y *D4*; 6, 7 y 8 g planta⁻¹, respectivamente, Cuadro 3.2), y la monocultura (*D5*, 22 g planta⁻¹) de altamisa. Por el contrario, y a diferencia del año 2006, el tipo y la dosis de herbicida no ejerció ningún efecto sobre esta fracción de biomasa por superficie (74 y 69 g m⁻², *H-* y *H+*, respectivamente) y por planta (12 y 10 g planta⁻¹, *H-* y *H+*, respectivamente) (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.1 Valores de probabilidad resultantes del análisis de la varianza de la biomasa de H e I y aceite esencial de altamisa (%) y análisis de la covarianza del aceite esencial por superficie (ml m^{-2}) para los tratamientos de densidad (*D*) y herbicida (*H*) y sus interacciones en el 2006 y 2007.

Valores de p del F-test							
Año	Factor	g.l.	Biomasa de H e I			Aceite esencial	
			g m^{-2}	g planta^{-1}	%*	g.l.	ml m^{-2}
2006	Bloque	2	0,47	0,51	0,06	2	0,52
	<i>D</i>	3	<0,001	0,08	0,01	3	0,02
	Bloque x <i>D</i>	6	0,49	0,57	0,62	6	0,16
	<i>H</i>	1	<0,001	<0,001	<0,001	1	<0,001
	<i>D</i> x <i>H</i>	3	<0,01	<0,01	0,03	3	<0,001
	BA	-				1	<0,001
	Error	32				31	
2007	<i>D</i>	3	<0,001	<0,05	0,99	3	0,01
	Repetición x <i>D</i>	8	0,18	0,11	0,94	8	0,97
	<i>H</i>	1	0,38	0,35	0,03	1	0,72
	<i>D</i> x <i>H</i>	3	0,35	0,30	0,97	3	0,58
	BA	-				1	<0,01
	Error	32				31	

BA: biomasa aérea de H e I de altamisa por superficie. Variable continua utilizada en el ANCOVA.

Cuadro 3.2 Biomasa de H e I por superficie (g m^{-2}) y planta (g planta^{-1}) y concentración (%) y producción de aceite esencial (ml m^{-2}) según los factores de densidad (*D*) y herbicida (*H*) durante el 2006 y 2007.

Año	Factor	Nivel	Biomasa de H e I		Aceite esencial		
			g m^{-2}	g planta^{-1}	%*	ml m^{-2}	
2006	Densidad	<i>D2</i>	107,71 (57,08) c	53,85 (28,54)	0,33 (0,04) a	42,56 (20,06) a	
		<i>D3</i>	178,54 (76,76) bc	44,63 (19,18)	0,31 (0,04) a	78,17(34,48) a	
		<i>D4</i>	240,15 (63,35) ab	30,01 (7,91)	0,33 (0,03) a	81,20 (20,27) b	
		<i>D5</i>	282,99 (63,03) a	35,37 (7,88)	0,22 (0,02) b	67,38 (14,46) b	
	Herbicida	<i>H-</i>	353,18 (43,76) a	75,06 (14,48) a	0,38 (0,02) a	121,40 (21,52) a	
		<i>H+</i>	51,51 (24,18) b	6,90 (2,98) b	0,21 (0,01) b	13,27 (9,80) b	
2007	Densidad	<i>D2</i>	13,18 (2,30) c	6,59 (1,15) b	0,66 (0,03)	5,91 (1,10) a	
		<i>D3</i>	29,29 (7,15) bc	7,32 (1,78) b	0,65 (0,06)	11,27 (3,17) a	
		<i>D4</i>	65,06 (18,28) b	8,13 (2,28) b	0,65 (0,04)	28,50 (9,53) b	
		<i>D5</i>	180,54 (22,49) a	22,56 (2,81) a	0,66 (0,04)	83,22 (14,23) c	
	Herbicida	<i>H-</i>	74,94 (13,31)	12,26 (1,48)	0,60 (0,03) b	29,08 (6,95)	
		<i>H+</i>	69,09 (20,20)	10,04 (2,39)	0,71 (0,02) a	35,37 (10,25)	

Dentro de cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, con un nivel de significancia de $p < 0.05$ según Test de Tukey. Entre paréntesis se encuentra el error estándar de la media. Las interacciones significativas *DxH* de la biomasa de H e I, de la concentración y producción de aceite esencial se graficaron en las Fig. 3.1; 3.2 y 3.3, respectivamente.

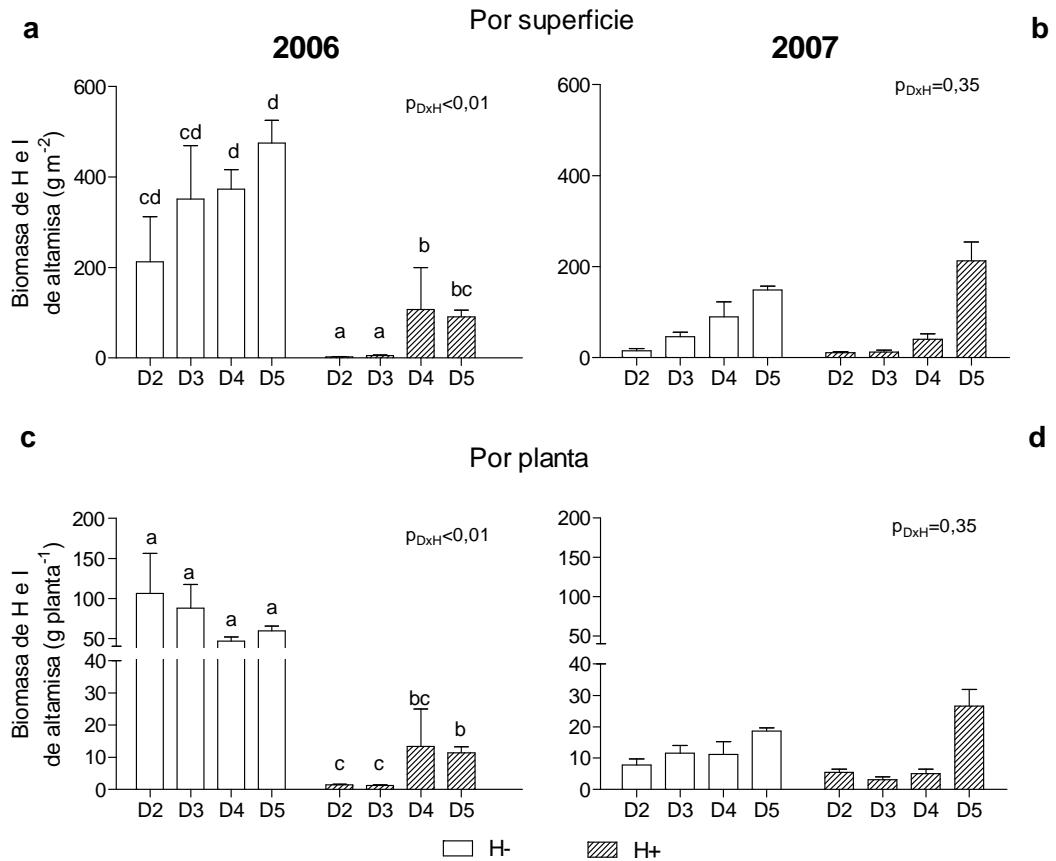


Figura 3.3 Biomasa de H e I de altamisa por superficie (g m⁻²) (a y b) y por planta (g planta⁻¹) (c y d) según los tratamientos de densidad (D2, D3 y D4 ; 2,4 y 8 plantas de altamisa m⁻² y D5, monocultura de altamisa) y herbicida (H- y H+, sin y con aplicación de glifosato) en el 2006 (a y c) y 2007 (b y d). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ según Test de Tukey.

La concentración de aceite esencial en H e I en el año 2006 fue diferente según el nivel de competencia y la presencia de herbicida ($p=0,03$, Fig. 3.4; Cuadro 3.1). En ausencia de herbicida, a bajas densidades de altamisa (D2, D3 y D4) la concentración de esencia fue mayor que en altamisa pura (D5), variando entre un 0,5-0,4 %. Mientras que con herbicida la concentración disminuyó hasta un 0,2 % en todos los tratamientos. No hubo diferencias significativas entre los altos niveles de densidad (D4, 8 plantas m⁻²) sin herbicida y la monocultura de altamisa (Fig. 3.4).

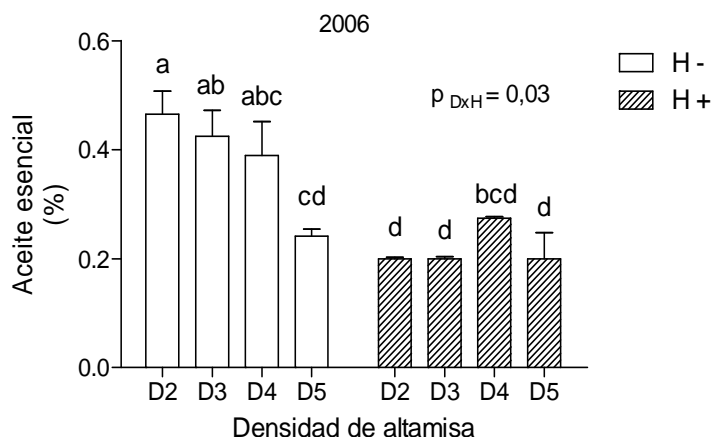


Figura 3.4 Concentración de aceite esencial de H e I (% , ml de aceite esencial/ 100 g biomasa de H + I) según los tratamientos de densidad y herbicida en el año 2006. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, con un nivel de significancia de $p < 0,05$ según Test de Tukey.

En el 2007, no se encontraron diferencias significativas en la concentración del aceite esencial de altamisa en los niveles de densidad explorados ($p=0,99$; Cuadro 3.1). No obstante, la concentración de terpenos aumentó significativamente ($p=0,03$) de 0,60 a 0,71 % cuando las plantas estuvieron expuestas al herbicida.

La biomasa de H e I de altamisa (covariable) por planta resultó ser la variable que influyó en respuesta a la producción de aceite esencial por superficie ($p < 0,001$; Cuadro 3.1) para ambos años de experimentos. Este resultado fue evidenciado a través del alto coeficiente de regresión detectado entre la producción de esencia y la biomasa de altamisa por superficie ($R^2=0,85$; $p < 0,001$) para el 2006 y ($R^2=0,83$; $p < 0,001$) para el 2007.

En el año 2006, hubo un efecto de interacción de la densidad y el herbicida sobre la producción de terpenos por superficie ($p < 0,001$ Cuadro 3.1). En ausencia de herbicida y para el rango de densidades exploradas, no se observaron cambios en la producción del aceite esencial (ml m^{-2}) (Fig. 3.5 a). Sin embargo, en presencia de glifosato, los niveles de terpenos aumentaron con la densidad, desde un valor promedio de $0,57 \text{ ml m}^{-2}$ a bajas densidades (D2) hasta 28 ml m^{-2} en las parcelas de alta densidad (D4).

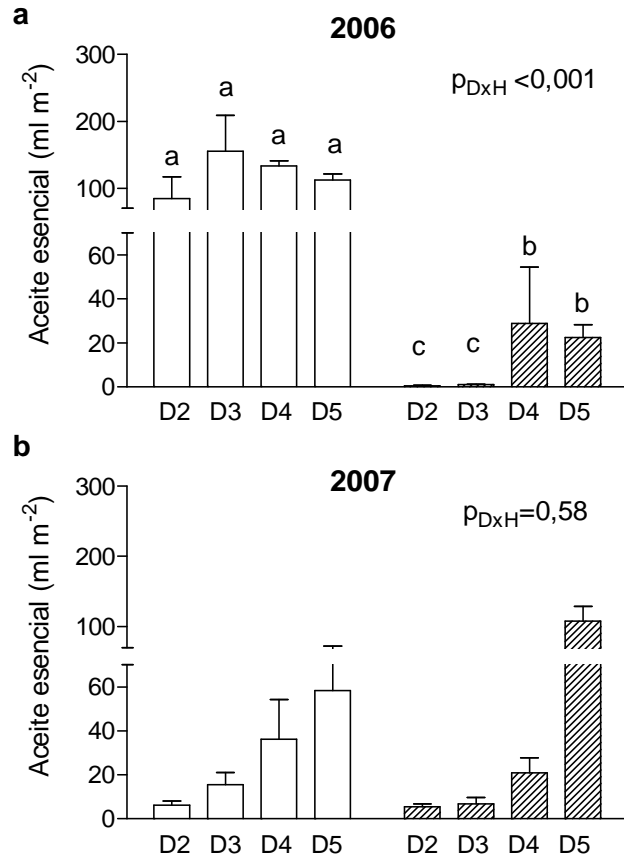


Figura 3.5 Aceite esencial de H e I de altamisa por superficie (ml m⁻²) según los tratamientos de densidad y herbicida en el año 2006 (a) y 2007 (b). Las barras indican la media y las líneas verticales el error estándar de la media.

Por el contrario en el segundo experimento a campo (2007) la producción de terpenos por planta no difirió significativamente para los factores de densidad y herbicida testeados (Fig. 3.5 b). Asimismo, la producción de aceite esencial de altamisa por superficie varió según el nivel de densidad ($p < 0,01$). A bajas densidades (D2 y D3) el nivel de terpenos varió desde 5,91 ml m⁻² en las bajas densidades (D2) hasta 28,5 ml m⁻² en las altas densidades (D4). El mayor valor de aceite esencial se encontró en las monoculturas de altamisa (Fig. 3.5). A diferencia del primer experimento, en el segundo año no hubo efecto del herbicida sobre la producción del aceite esencial ($p = 0,72$, 29 y 35 ml m⁻² en H- y H+, respectivamente, Cuadro 3.1 y 3.2).

3.3.2 Cambios relativos de la biomasa, producción y concentración de aceite esencial

En el año 2006, las plantas de altamisa creciendo a bajas densidades (D2 y D3) y sin herbicida (cuadrante B, Fig. 3.6 a), tuvieron una mayor síntesis relativa de estos compuestos, dado por el incremento en el tamaño de las plantas y el aumento en el contenido y concentración relativa de terpenos. Mientras que con herbicida (cuadrante E, Fig. 3.6 a) tanto la biomasa como la producción relativa de aceite esencial fue menor sin cambios en la concentración relativa de aceite esencial. A altas densidades (8 plantas de altamisa m⁻², D4), independientemente de la aplicación de herbicida, la concentración relativa de terpenos fue mayor. Sin embargo, con herbicida, la

producción relativa aumentó proporcionalmente a la concentración relativa de aceite esencial y sin mostrar cambios en el tamaño de las plantas (Línea G, Fig. 3.6 a). Mientras que sin glifosato, al aumentar la concentración relativa de aceite esencial, el tamaño de las plantas se redujo sin variar la producción relativa de terpenos (línea F, Fig. 3.6 a).

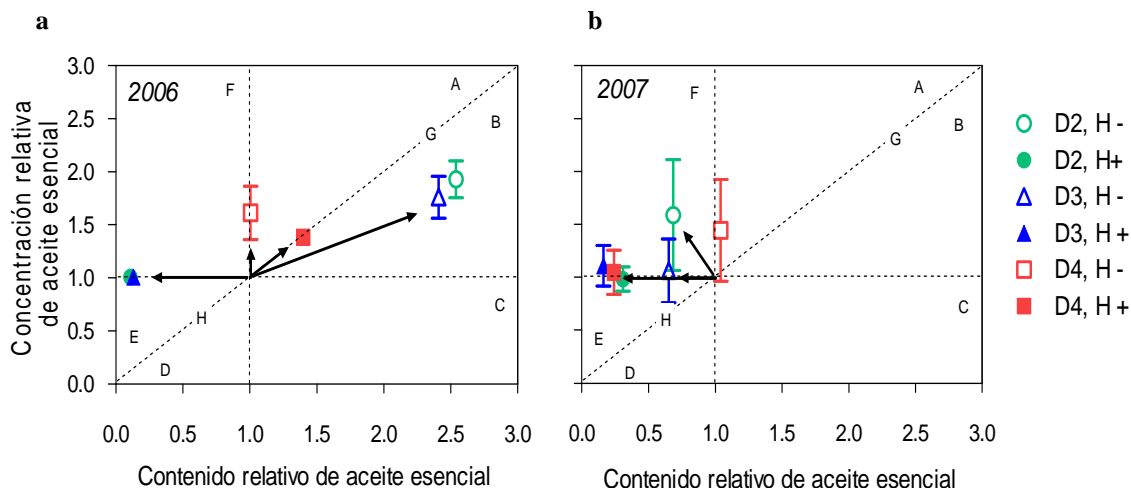


Figura 3.6 Cambios vectoriales en el contenido relativo (ml/ml) y en la concentración relativa (%/%, expresado sobre base seca) de aceite esencial de altamisa en relación a los tratamientos de herbicida: sin aplicación de glifosato (*H*-, símbolos vacíos) y con aplicación (*H*+, símbolos llenos) y los niveles de densidad: *D2* (círculos), *D3* (triángulos) y *D4* (cuadrados), (2, 4 y 8 plantas de altamisa m^{-2} , respectivamente), en los años 2006 (a) y 2007 (b).

En el análisis vectorial gráfico (GVA) para el año 2007, la reducción en el crecimiento de las plantas de altamisa fue un factor denominador de todos los tratamientos de densidad y herbicida. Sin embargo, los tratamientos con herbicida estuvieron agrupados independientemente del factor densidad sin cambios en la concentración relativa del aceite esencial, pero con reducciones en la producción relativa con respecto al tratamiento control y asociadas al menor tamaño de plantas (cuadrantes E y F, Fig. 3.6 b). Sin herbicida en cambio, la densidad más baja (*D2*) estuvo asociada no sólo a una reducción en el tamaño de las plantas con respecto a su control, sino también a un incremento en la concentración y contenido relativos de aceite esencial (cuadrante F, Fig. 3.6 b), mientras que las densidades intermedias (*D3*) y altas (*D4*), tuvieron un comportamiento opuesto: En *D3*, se mantuvo constante la concentración relativa aceite esencial pero con cambios en su contenido relativo y en *D4*, se incrementó la concentración relativa de los metabolitos secundarios pero sin cambios notables en el contenido (Fig. 3.6 b).

3.3.3 Composición del aceite esencial

En el análisis del aceite esencial de altamisa se identificaron 39 compuestos de los 45 separados del aceite esencial de las H e I de altamisa, detectándose los mismos componentes entre los tratamientos de densidad y herbicida y entre años. El componente mayoritario fue el alcanfor, seguido por el 1,8 cineol y el germacreno D y en menor medida el beta-cariofileno (Cuadro Anexo 3.1 a y b).

En el año 2006 el porcentaje de la varianza explicado por los 2 primeros ejes fue de 20,9 % y 12 % respectivamente (Fig. 3.7). El ordenamiento mostró un contraste sobre el eje 1 entre los tratamientos *D5* (con y sin H) y el resto. En el eje 2, entre los tratamientos *D2* y *D5* con el tratamiento *D4*. En el análisis de la composición de terpenos volátiles se tomó a los valores mayores (scores) a 0,40 como terpenos indicadores de correlación con los ejes 1 o 2. De esta manera, los compuestos minoritarios que mostraron mayor correlación positiva con el eje 1 fueron el alfa-tuyeno, el limoneno, el gamma-terpineno, epoxi-mirceno y el alfa-copaeno, mientras que el alfa cangolenal y el mircenol se asociaron negativamente con éste mismo eje. Los terpenos limoneno, gama-terpineno, alfa-canfolenal, tras-carveol, carvona e isobutilfenil acetato se asociaron positivamente con el eje 2 y el epoxi-mirceno de manera negativa con éste eje (Fig. 3.7; Cuadro Anexo 3.2). En cuanto a las variables explicatorias, la producción y concentración de aceite esencial, la biomasa aérea de altamisa y la concentración (%) de terpenos se correlacionaron positivamente con el eje 1 pero, negativamente con el eje 2. Mientras que la biomasa aérea total se correlacionó negativamente con el eje 2 (Cuadro 3.3). En el cuadrante superior izquierdo se ubicaron los tratamientos (*D2 H-*) de mayor producción y concentración de terpenos y en el cuadrante inferior izquierdo (*D4*) los de mayor biomasa de altamisa. Las monoculturas con herbicida (*D5 H+*) estuvieron ubicadas en el cuadrante superior derecho, con menores valores de biomasa.

En el segundo año (2007) el porcentaje de la varianza explicado por los 2 primeros ejes fue levemente menor con respecto al primer año, arrojando un valor de 20,6 y 7 % para el primero y segundo eje, respectivamente. El ordenamiento mostró un contraste entre los tratamiento con y sin herbicida en el eje 1 y entre el tratamiento *D2 H-* y el resto de los tratamientos, en el eje 2. Los terpenos que mostraron mayor correlación positiva con el eje 1 fueron el epoxi-mirceno, alfa-canfolenal, trans pinocarveol, isobutil fenil acetato y el 1,7-diepi-alfa-cedrenal y negativamente con el eje 1 el alfa-tuyeno y el mircenol. Mientras que los terpenos gamma-terpineno y carvona se asociaron positivamente con el eje 2 y el alfa tuyona y el alfa-humuleno negativamente con éste eje (Fig. 3.7; Anexo 3.2).

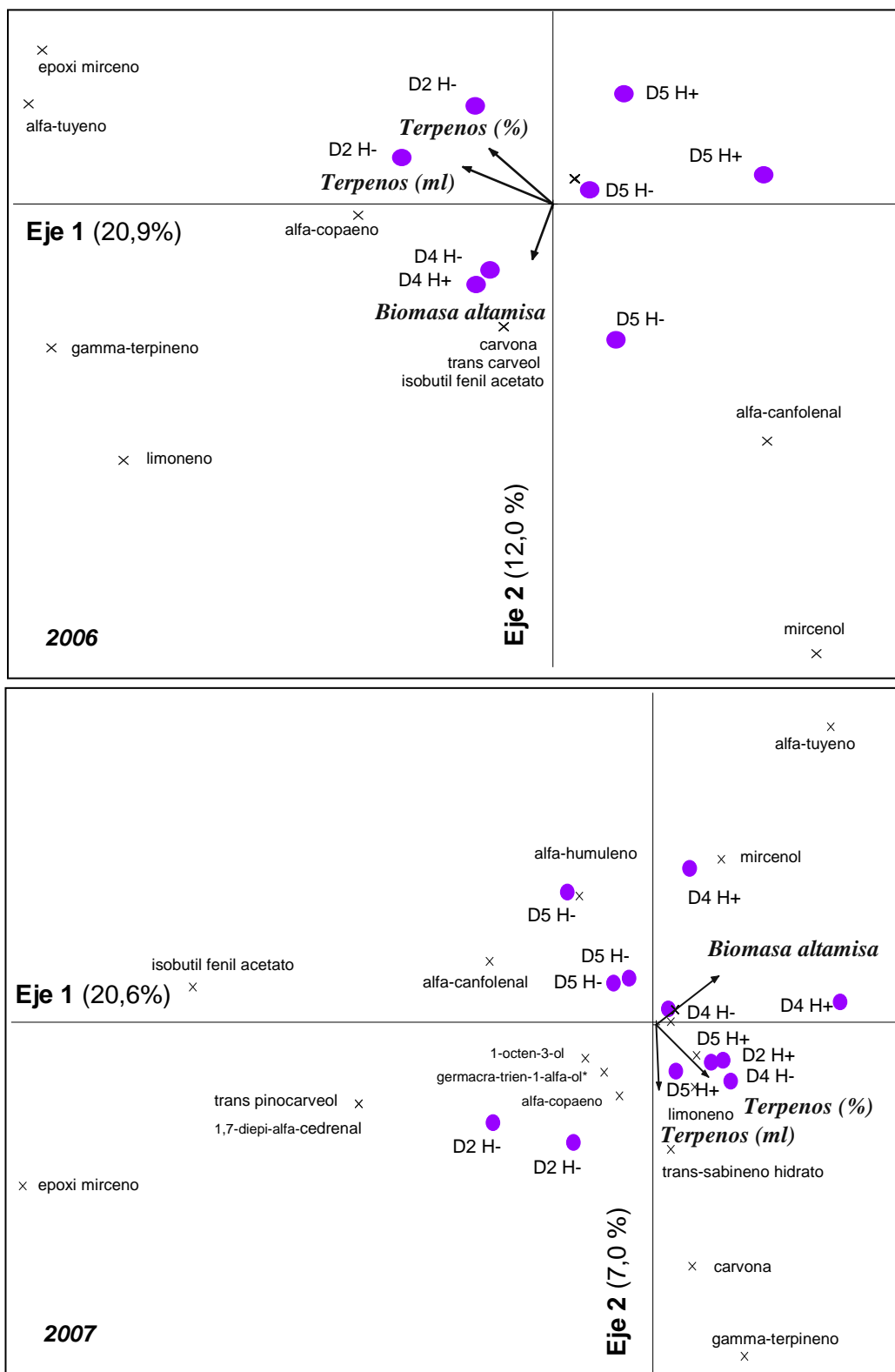


Figura 3.7 Representación gráfica de los dos primeros ejes de ordenamiento de correspondencia canónica, considerando los compuestos como matriz principal y la biomasa aérea total de altamisa, la producción (ml) y concentración (%) de aceite esencial y la presencia o ausencia de herbicida como matriz secundaria para el año 2006 y 2007. Los vectores o *biplots* indican las variables explicatorias. Ver Cuadro Anexo 3.2

Al igual que en el 2006, tanto el porcentaje como la producción de aceite esencial estuvieron asociados con el eje 2, pero de manera opuesta (negativamente para el 2006 y positivamente para el 2007). En el caso de la biomasa aérea de altamisa, se asoció positivamente al eje 1. (Cuadro 3.3). Es destacable que tanto la producción como la concentración de terpenos fueron las variables explicatorias que se asociaron con el mismo signo sobre los ejes y de manera positiva y negativa con el eje 1 y 2, respectivamente en el 2006 y con el eje 2 en el año 2007. Por otro lado, el compuesto epoxi-mirceno estuvo asociado positivamente al eje 1 y al tratamiento *D2 H-* para ambos años de experimentos (Fig. 3.7).

También es notable que de los 39 compuestos identificados, sólo 6 sean los que explicaron principalmente la distribución de los tratamientos en los dos años (Cuadro Anexo 3.2)

Cuadro 3.3 Coeficientes de correlación entre los datos de la composición del aceite esencial y las variables explicatorias de los dos ejes principales del ACC de los años 2006 y 2007.

	2006		2007	
	Eje 1	Eje 2	Eje 1	Eje 2
Coeficiente de correlación de Pearson	0,739	0,795	0,719	0,826
Biomasa aérea total de altamisa(g m ⁻²)	0,198	0,691	0,814	-0,367
Aceite esencial, producción (ml m ⁻²)	0,868	-0,464	0,139	0,818
Aceite esencial, concentración (%)	0,611	-0,685	-0,443	0,857

3.3.4 Producción de artemisinina en la biomasa aérea de *H e I* y su acumulación en el carbón activado

Hubo una relación lineal positiva ($p < 0,0001$) y distinta de cero, entre la artemisinina acumulada en el tejido aéreo, calculada sobre la base de las determinaciones del % de artemisinina en los tejidos de *H e I* (Cuadro Anexo 3.3) y la artemisinina acumulada en el carbón activado (Fig. 3.8 a). La pendiente fue menor a 1, indicando que no toda la artemisinina acumulada en el tejido llegó al suelo. No obstante, la relación encontrada, por un lado, refuerza los resultados del capítulo 2, poniendo de manifiesto que el carbón activado resultó ser un adsorbente efectivo para esta sustancia. Es decir que a medida que aumentó la artemisinina en el tejido aéreo, se incrementó la artemisinina adsorbida en el carbón activado no llegando a un nivel de saturación por parte del carbón dada la relación lineal positiva. Por otro lado, indica que a través de esta relación se puede cuantificar cuanto de la artemisinina generada en la biomasa aérea llega al suelo como tal, sin sufrir algún proceso de cambio (*i.e.* descomposición por parte de los microorganismos, transformación en otro compuesto, degradación, entre otros) (Fig. 3.8 a).

Asimismo la producción de artemisinina por unidad de superficie se incrementó ($p < 0,0001$) de una manera lineal positiva a medida que se incrementó la biomasa de altamisa (Fig. 3.8 b). Este aumento en la biomasa estuvo asociado a reducciones en el porcentaje de la artemisinina en hoja ($p < 0,001$) (Fig. 3.8 c). Cabe aclarar que el rango de variación de la biomasa (50 a 500 g m⁻²) fue superior al de la concentración de

artemisinina (0,22 a 0,42%). Si bien en ambos años el tratamiento con herbicida tuvo menores niveles de artemisinina, tanto en la biomasa aérea de altamisa, como en la cantidad retenida en el carbón activado, la concentración de este compuesto fue mayor.

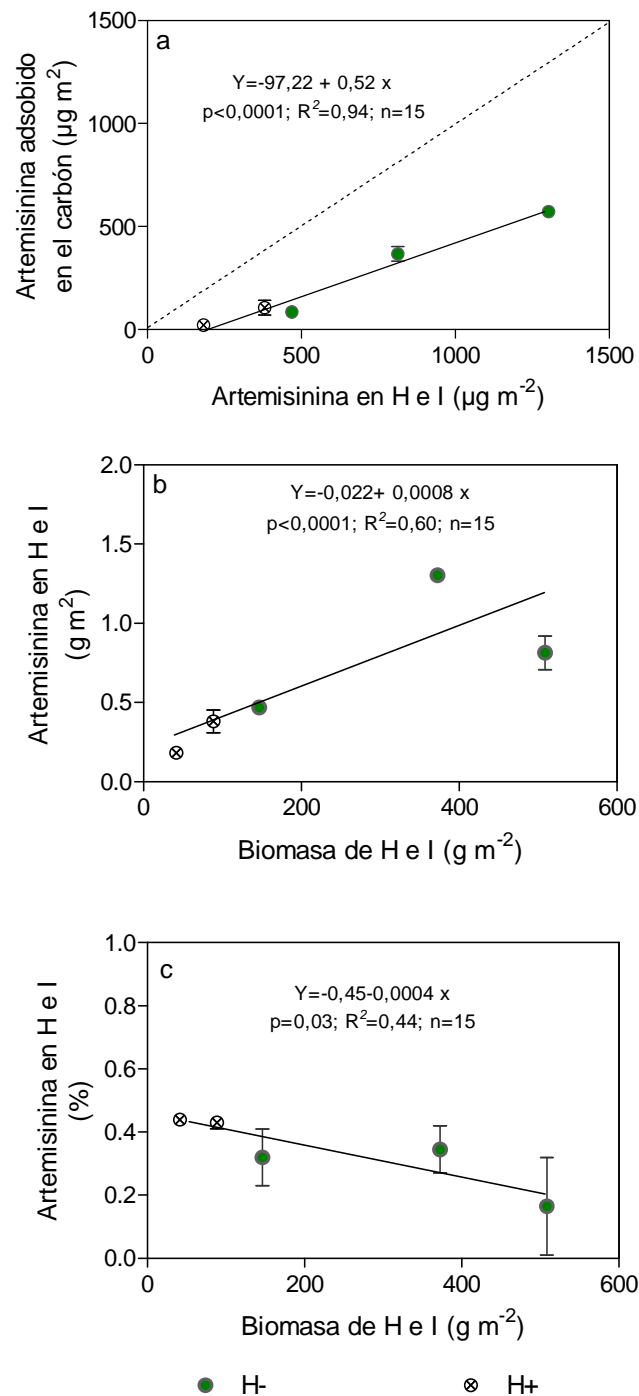


Figura 3.8 Relación entre la artemisinina adsorbida en el carbón activado (µg m⁻²) y la acumulada en H e I (µg m⁻²) (a), la artemisinina de H e I (g m⁻²) y la biomasa de H e I (g m⁻²) (b) y la concentración de artemisinina (%) de H e I en respuesta a la biomasa de altamisa de H e I (g m⁻²) (c).

En ambos años de experimento no se encontró interacción entre la densidad y herbicida sobre el contenido de artemisinina retenido en el carbón activado ($p=0,52$ y $p=0,90$, respectivamente). Sin embargo, al analizar los factores individuales, el incremento en el número de plantas de altamisa ocasionó un aumento del contenido de artemisinina de 73 a 475 μg por kg de carbón en el 2006, y de 11 a 208 μg por kg de carbón en el 2007, en las parcelas $C+$ ($p<0,001$ y $p<0,01$, para ambos años respectivamente, Cuadro 3.4). Las diferencias más notables de este cambio, se dieron en el 2006, donde a altas densidades ($D3$ y $D4$, 291 y 876 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y en la monocultura de altamisa ($D5$, 475 $\mu\text{g kg}^{-1}$), los valores fueron significativamente más altos, con respecto a las bajas densidades ($D2$, 73 $\mu\text{g kg}^{-1}$). El nivel del aleloquímico adsorbido en el carbón estuvo relacionado con la biomasa de H e I de altamisa (Fig. 3.9). En el 2006, esta tendencia no fue tan marcada. Con respecto al tratamiento con herbicida, el contenido de artemisina varió desde 277 a 28 μg por kg de carbón activado adsorbido sin y con herbicida, respectivamente. Es decir, que la acumulación de artemisinina fue 10 veces mayor en ausencia de herbicida para el año 2006 ($p<0,01$; Cuadro 3.4). El menor nivel de artemisinina (21 $\mu\text{g kg}^{-1}$) alcanzado en las parcelas con herbicida para el 2006, podría estar asociado a la reducción en 10 veces la biomasa de altamisa alcanzada para el nivel $H+$ (Cuadro 3.2). Sin embargo en el 2007 la presencia de herbicida en las parcelas $H+$ no modificó la artemisinina retenida en el carbón ($p=0,86$; 54 y 61 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en $H-$ y $H+$, respectivamente, Cuadro 3.4), resultado que también estuvo asociado la falta de significancia de las biomásas de H e I de altamisa en ambos tratamientos de herbicida (74 y 69 g m^{-2} , $H-$ y $H+$, respectivamente, Cuadro 3.2).

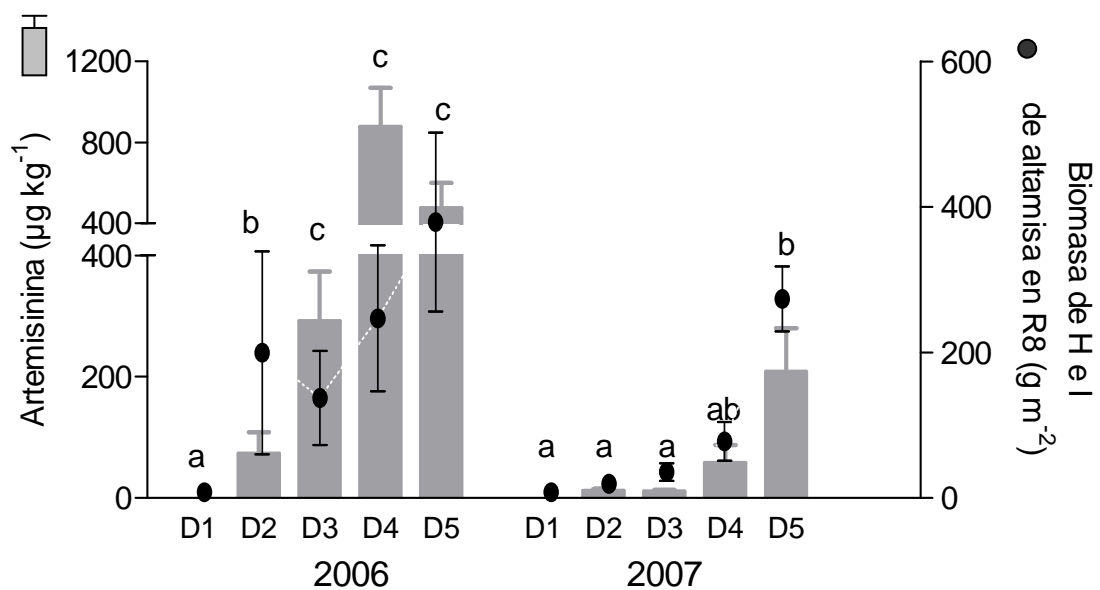


Figura 3.9 Contenido de artemisinina ($\mu\text{g kg}$ de carbón $^{-1}$) adsorbido en el carbón de las parcelas $C+$ (barras) y biomasa de H e I de altamisa (g m^{-2}) al momento de madurez de soja (R8) (círculos) según el tratamiento de densidad y año. Las letras indican diferencias significativas de artemisinina en los tratamientos de densidad para cada año, de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p<0,05$.

Cuadro 3.4 Valores medios de la artemisinina ($\mu\text{g kg}^{-1}$) adsorbida en el carbón activado al momento de la madurez de soja (R8) proveniente de las parcelas *C+* para los tratamientos de densidad (*D*) y herbicida (*H*) en los años 2006 y 2007. Entre paréntesis se indica el error estándar de la media.

		Artemisinina en el carbón activado	
Factor	Nivel	$\mu\text{g kg}^{-1}$	
		2006	2007
Densidad	<i>D1</i>	0 a	0 a
	<i>D2</i>	73,05 (35,25) b	11,67 (3,72) a
	<i>D3</i>	291,70 (81,60) c	10,94 (2,97) a
	<i>D4</i>	876,58 (193,55) c	58,35 (29,21) ab
	<i>D5</i>	475,08 (125,25) c	208,33 (71,69) b
	p=	<0,001	<0,01
Herbicida	<i>H-</i>	277,75 (58,80) a	54,67 (21,25)
	<i>H+</i>	21,88 (9,42) b	61,05 (35,67)
	p=	<0,01	0,86

La interacción *DxH* no fue significativa para ambos años (2006, $p=0,52$ y 2007, $p=0,90$). El test de comparación de medias (Test de Tukey) se muestra en la Fig. 3.7.

3.3.5 Relación de la artemisinina y su efecto sobre la soja

El peso específico de nódulos para el año 2006 sin herbicida, fue significativamente mayor en las densidades *D3* y *D4* en presencia de la artemisinina en el suelo ($p<0,001$) (Fig. 3.10). Sin embargo solo con alta competencia (*D4*) se incrementó el rendimiento en la parcela *C-* con respecto a la parcela con carbón (llamada control), con un promedio de 48 μg de artemisinina por kg de carbón. En el caso del año 2007 y para el mismo tratamiento de herbicida, no se encontraron diferencias entre el peso específico de los nódulos ni tampoco sobre el rendimiento en grano. Es notable también que la acumulación de artemisinina en estas parcelas fuera de menor contenido que para el 2006.

Con respecto al herbicida es destacable la diferencia que peso de nódulos observada en las parcelas con artemisinina (*C-*) ($p<0,001$) para el año 2006. Sin embargo, las diferencias encontradas en esta variable no se traducen en diferencias marcadas en el rendimiento a pesar de encontrarse altos niveles de artemisinina en el suelo (336 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de carbón). Asimismo, para el 2007, no se observaron diferencias en tanto en el tamaño de nódulos como en el rendimiento (Fig. 3.10).

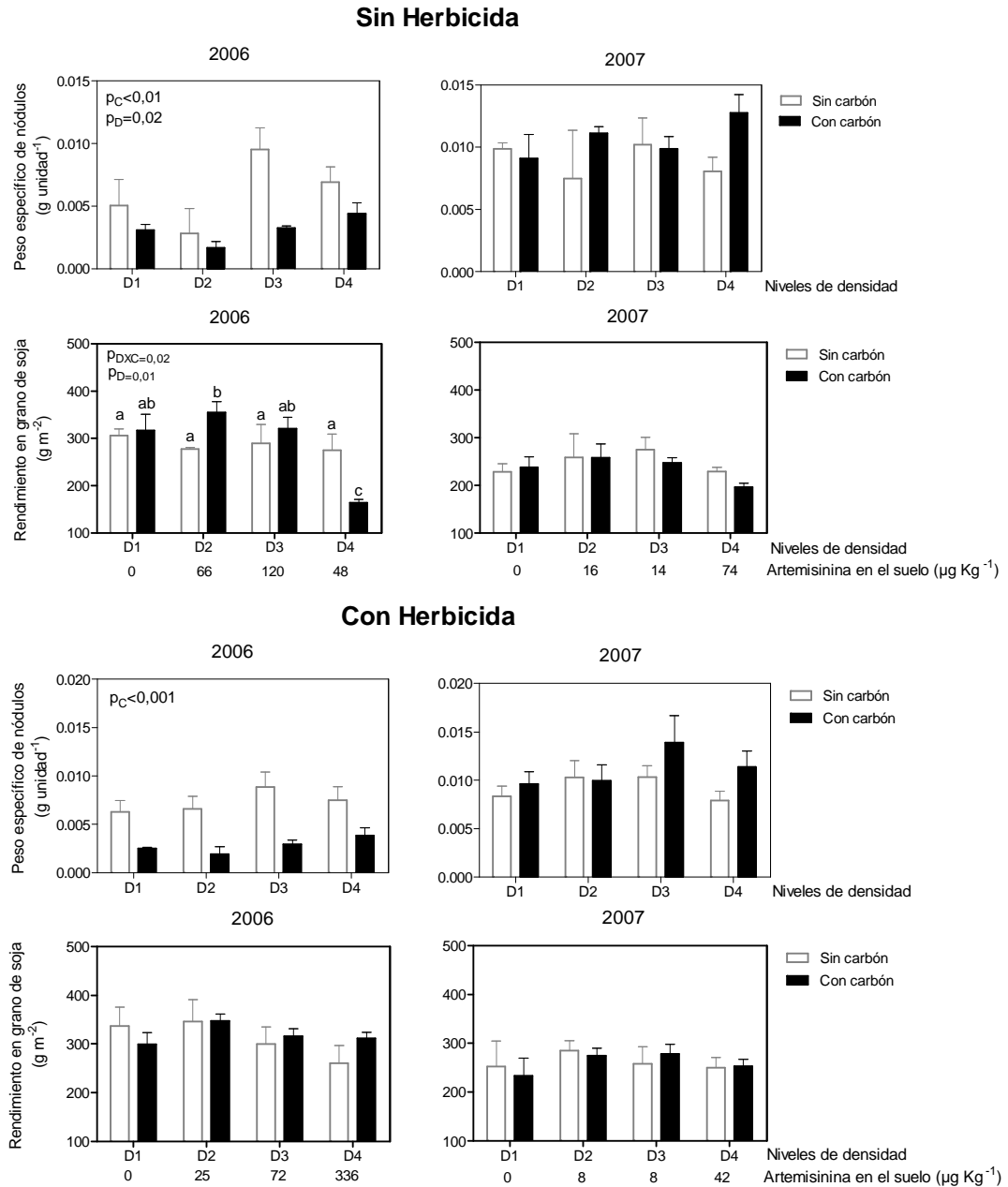


Figura 3.10 Peso específico de nódulos (g unidad nódulo⁻¹) y rendimiento en grano de soja en función de los niveles de densidad (D1, D2, D3 y D4) y artemisinina en el suelo (µg kg⁻¹ de carbón) para el tratamiento C-, sin carbón (barras blancas) y C+, con carbón (barras negras), con y sin herbicida en el año 2006 y 2007. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$.

3.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó el efecto de la densidad de plantas de altamisa y de dosis subletales de herbicida sobre (i) la producción de biomasa de H e I de altamisa (ii) la producción y acumulación de los aleloquímicos (aceite esencial y artemisinina) en H e I (iii) la composición del aceite esencial y (iv) la acumulación de artemisinina en el medio edáfico, y su relación con la producción de soja.

Sólo en el año 2006 se evidenció una interacción entre la densidad y el herbicida sobre la biomasa de H e I de altamisa por unidad de superficie y por planta. De acuerdo a lo reportado por Weidenhamer (2008), el incremento en el número de plantas de altamisa, aumentó la competencia interespecífica en los tratamientos con herbicida. En ambos años la biomasa por planta fue menos afectada por el herbicida en *D5* que en las densidades *D2* y *D3* (siendo sólo significativo para el 2006). Esta interacción podría estar causada por un efecto de dilución del herbicida ya que la dosis se aplica por área sembrada lo cual llevaría a repartir la misma dosis entre mas individuos generando por lo tanto menor absorción y concentración del herbicida por planta (Weidenhamer *et al.*, 1989).

Con respecto al aceite esencial de altamisa, se esperaba que como respuesta de las plantas al estrés por herbicida (Weidenhamer y Callaway, 2010) y alta competencia (Thijs *et al.*, 1994; Albuquerque *et al.*, 2011) hubiera una mayor concentración y producción (ml m^{-2}) de aceite esencial en los tratamientos con glifosato y altas densidades. Sin embargo, la respuesta fue diferencial según el año. En el 2006, la baja producción y concentración de terpenos en el tratamiento de alta densidad y herbicida (*D4 H+*) comparado con los tratamientos sin herbicida, puede deberse a que por un lado, en este año, el efecto del herbicida sobre las plantas, a pesar de ser la misma dosis de glifosato, fue mayor, hecho que produjo una reducción de casi 10 veces en la biomasa. Esta reducción en la biomasa produjo como consecuencia reducciones en la síntesis (Veteli *et al.*, 2007) y puede haber ocasionado la menor producción y concentración de aceite esencial en los tricomas glandulares de las hojas de altamisa. En cambio en el 2007, el impacto del herbicida no tuvo efecto sobre la producción del aceite esencial pero sí produjo incrementos en la concentración de los aleloquímicos (de 0,60 a 0,71 % en las parcelas *H-* y *H+*, respectivamente), en concordancia con las investigaciones de Vila-Aiub y Ghersa (2005) en plantas de *Lolium sp.* Asimismo, el incremento en la concentración del aceite esencial en respuesta a dosis subletales de herbicida (Weidenhamer y Callaway, 2010), podría deberse a una redistribución del uso de los esqueletos carbonados entre vías metabólicas vegetales (*i.e.* acetato/mevalonato). En relación a la densidad y, así como lo reportado por Damtew *et al.* (2011), el incremento en las densidades de altamisa exploradas en el 2007 no proporcionó aumentos en la concentración (%) del aceite esencial a pesar de haberse afectado el crecimiento a alta densidades (*D4*). Por otro lado, la reducción (en *D4*) de la producción del aceite esencial producto de la competencia interespecífica (*D5*, 83 g m^{-2} a *D4*, 28 g m^{-2}), puede deberse al menor crecimiento de las plantas causada por una disminución en la captura de nutrientes y menor exposición a la luz (Khorshidi *et al.*, 2009). La diferencias en la calidad de luz percibida por las plantas en alta competencia (*D4*), un factor importante en la biosíntesis de estos metabolitos secundarios (Sangwan *et al.*, 2001), podría ser otro factor que explique los menores valores de aceite esencial en estos tratamientos.

El rango de variación de la producción del aceite esencial de altamisa de los experimentos (0,21-0,71 %) estuvo dentro de los reportados por otros autores: 0,32-0,52 % (Malik *et al.*, 2009) y 0,75-0,94 %, (Damtew *et al.*, 2011). Sin embargo, otros

trabajos señalan un rango de variación mas amplio y superior a los hallados (0,01-1,9 %) (Bagchi *et al.*, 2003; Namdeo *et al.*, 2006), Las diferencias encontradas en estos trabajos puede deberse a que el contenido de aceite esencial es afectado por numerosos factores del ambiente, entre ellas, condiciones de crecimiento, densidad de plantas, propiedades del suelo y ecotipos (Özgüven *et al.*, 2008).

La variación en la concentración de uno o varios aleloquímicos puede estar dada por cambios en el contenido (ml), en la biomasa de las plantas o en ambas (Koricheva, 1999). El análisis vectorial gráfico fue una herramienta útil para analizar el efecto del ambiente agronómico (densidad y herbicida) sobre la concentración y contenido relativos del aceite esencial y la biomasa relativa de las plantas de altamisa. El análisis GVA mostró un aumento en la concentración relativa del aceite esencial al incrementarse la densidad de altamisa (*D4*) en ausencia de herbicida para ambos años. De acuerdo de Veteli *et al.* (2007), éste incremento en la concentración estaría dado por un aumento en la síntesis de los terpenos y no por un aumento en la biomasa de la planta. Estos resultados se contraponen con las investigaciones realizadas por Damtew *et al.* (2011), quienes observaron que la producción y concentración de los aleloquímicos (aceite esencial y artemisinina) se mantuvo constante con incrementos de la densidad de 6 a 15 plantas m^{-2} de altamisa aún con disminuciones en la biomasa de hojas por planta de *A. annua*. Sin embargo, estos autores hallaron que incrementos en la densidad superiores a 27 plantas m^{-2} redujeron tanto la biomasa por planta como la concentración del aceite esencial y de artemisinina, pero se incrementó la producción ($ml\ m^{-2}$) del aceite esencial (Damtew *et al.* 2011). Es probable que con las densidades menores (6 a 15) no estaban en competencia plena mientras que a la densidad superior si, y de allí las diferencias en concentración. En cambio a bajas densidades (*D2* y *D3*), y en ausencia de herbicida para el 2006, el incremento tanto del contenido de aceite esencial como en su concentración, estuvo relacionado con un aumento en el tamaño de las plantas de altamisa y, probablemente, por un aumento en la síntesis. Este mismo patrón se observó en otros trabajos para otras especies y metabolitos secundarios (Veteli *et al.*, 2007). Por ejemplo los estudios de Lavola y Julkunen-Tiitto (1994) y Veteli *et al.* (2007) demostraron un incremento en la producción y concentración de flavonoides en las especies *Betula pendula* Roth y *Salix myrsinifolia* Salisb., debido a un aumento concomitante de la síntesis de este compuesto y su biomasa, ante el incremento de CO_2 atmosférico como agente de estrés. Por otro lado, los niveles de densidad *D2* y *D3* con herbicida, mantuvieron el mismo patrón ambos años: se redujo el contenido relativo de aceite esencial, debido a una disminución de la biomasa relativa de las plantas. Esta respuesta puede estar asociada a que por un lado, las plantas de altamisa a bajas densidades, absorbieran más el herbicida (Weidenhamer, 2008) por unidad de planta, y de esta manera afectarían el crecimiento, y como resultado su contenido (ml) en aceite esencial.

Con respecto a la composición del aceite esencial de altamisa en todos los tratamientos se separaron 45 compuestos, a diferencia de otros estudios, identificaron 16 (Verma *et al.*, 2011), 17 (de Magalhães *et al.*, 2004), 33 (Ma *et al.*, 2007), 36 (Tzenkova *et al.*, 2010) y 113 (Cavar *et al.*, 2012) componentes del aceite esencial de plantas de *A. annua* creciendo en la India, Brasil, China, Bélgica y Bosnia, respectivamente. En coincidencia con lo reportado por de Magalhães *et al.* (2004) y Verma *et al.* (2011) el alcanfor fue componente principal del aceite esencial, alcanzando valores medios de 35 %, independientemente de los tratamientos de densidad y herbicida. Sin embargo, otros estudios destacan la importancia del cariofileno (24 %) o la artemisia cetona (30,7 %) como constituyente principal del aceite esencial (Tzenkova *et al.*, 2010; Cavar *et al.*, 2012). Esta variación consistente de la composición (en cantidad y proporción relativa)

de los terpenos de altamisa entre los distintos ambientes, podría deberse a la presencia de poblaciones químicamente diferentes (quimiotipos), dentro de una misma especie (Tétényi, 1986). En numerosas ocasiones cada quimiotipo tiende a estar asociado con un ambiente particular (Morgan, 1989; Salgueiro *et al.*, 1995). Si bien es común encontrar diferencias químicas entre poblaciones de una misma especie, es difícil establecer el número de quimiotipos dentro de la misma. Esto se debe principalmente a que la composición química de una planta está determinada por el genotipo interactuando con su ambiente (Hay y Waterman, 1993; Lambers *et al.*, 1998). De todos modos las propiedades biológicas de los terpenos son la resultante de una compleja mezcla de numerosas moléculas, y por ello, el efecto de los metabolitos secundarios hacia la especie receptora está dado más por un conjunto de terpenos (Inderjit *et al.*, 2001) que por un solo compuesto, aunque su proporción relativa dentro de la mezcla sea mas importante (Cavar *et al.*, 2012).

La composición del aceite esencial presentó un contraste entre las plantas sin y con herbicida para las bajas y altas densidades, respectivamente. Algunos compuestos respondieron a los tratamientos. Por ejemplo, el epoxi-mirceno siempre estuvo asociado a los tratamientos sin herbicida y bajas densidades (*D2 H-*) y el alfa-canfolenal se relacionó con las plantas de monocultura de altamisa (*D5*) con herbicida para el 2006, y sin presencia del herbicida en el año 2007. Esto sugiere, que estos compuestos, podrían ser indicadores, de condiciones con o sin herbicida y del nivel de competencia ejercido por altamisa. Estos cambios en la composición de los terpenos según las condiciones del estrés por herbicida, podrían indicar que el glifosato redujo la síntesis de aminoácidos aromáticos (Duke, 1988) por inhibición parcial de la enzima EPSPS (shiquimato-3-fosfato fosfoenolpiruvato sintetasa), conduciendo a un reordenamiento en el uso del carbono entre vías del metabolismo secundario de la altamisa o indirectamente a nivel general de estrés en la planta (Einhelling, 1999), provocando otro tipo de alteraciones como en la biomasa (Weidenhamer y Callaway, 2010), o en otros metabolitos secundarios (Lydon y Duke, 1993).

Las diferencias halladas en la biomasa de H e I de altamisa y la producción del aceite esencial y de artemisinina entre los años de experimentos, pueden ser explicadas en gran medida, por variaciones en las condiciones meteorológicas interanuales. Los mayores valores registrados de estas variables en el 2006, pueden estar asociados al mayor crecimiento de las plantas de altamisa y la tasa fotosintética de las mismas, producto de un mayor PAR incidente (880 Mj m^{-2}) durante una menor estación de crecimiento (114 días) en el año 2006, en relación a 856 Mj m^{-2} durante 130 días del ciclo del cultivo en el 2007 (Figura Anexo 3.4).

La alelopatía es un fenómeno ecológico complejo (Weidenhamer, 2006), que puede estar enmascarado a nivel de cultivo, por otro tipo de interacciones (*i.e.* competencia, mutualismo) que son más fáciles de evaluar. De acuerdo con Inderjit y Nilsen (2003), la liberación de metabolitos secundarios es el principal requisito para que uno o varios compuestos jueguen un rol como sustancias alelopáticas. En este sentido, el uso del carbón activado en las parcelas tuvo por objetivo separar la interacción competitiva de la alelopática, tal como fue demostrado en otros trabajos (Nilsson, 1994; Lau *et al.*, 2008). La cuantificación de la artemisinina en el carbón activado confirma la posibilidad de un efecto alelopático a nivel de cultivo. Por otra parte, cabe recordar que el carbón activado no tuvo ningún efecto por si mismo sobre el crecimiento de las plantas de altamisa, como se demostró en el capítulo 2.

Diferentes trabajos (Nilsson, 1994; Perry *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2008) utilizan el carbón activado para separar estas interferencias tanto a nivel de macetas (Lau *et al.*,

2008) como de campo (Nilsson, 1994; Perry *et al.*, 2005) y por otro lado, existen en la bibliografía distintas metodologías de extracción de la artemisinina proveniente de los tejidos de la planta de altamisa (Delabays, 1997; Marchese y Rehder, 2001; Qian *et al.*, 2005). Sin embargo, no se han encontrado en la literatura reportes de la metodología de extracción de esta molécula adsorbida en el carbón activado. De acuerdo a Blair *et al.* (2009), la cuantificación de un compuesto desde una matriz tan compleja como el suelo o el carbón activado, requiere del desarrollo de una técnica o protocolo de extracción de manera de cuantificar de forma eficiente un determinado compuesto en el suelo. En este contexto, la información contenida en este capítulo, surge de experimentos en los que se utilizaron metodologías novedosas, por un lado a través de la aplicación de carbón activado para separar las interacciones competitivas y alelopáticas a campo y por otro lado, a través del desarrollo de un protocolo específico para cuantificar la artemisinina, principal compuesto alelopático de la altamisa (Delabays *et al.*, 2001).

A la luz de los resultados obtenidos para los dos años de experimentos, el contenido de artemisinina en el suelo aumentó con la densidad de altamisa y con el contenido de artemisinina en hoja. Estos resultados se relacionan con los hallados por Jessing *et al.* (2009), quienes encontraron un aumento en la concentración de artemisinina de 0,16 a 11,7 mg kg de suelo en los dos primeros cm del suelo, a medida que avanzó la estación de crecimiento de altamisa. Sin embargo, el máximo valor de artemisinina encontrado por estos autores (11,7 mg/kg de suelo) es casi el doble en relación al valor máximo encontrado en el presente capítulo (5,76 mg/kg de suelo, D4 en 2006). Estas diferencias podrían estar asociadas a las densidades de altamisa exploradas, a la metodología empleada de extracción o a la diferente degradación de la artemisinina en el suelo en relación a la retenida en el carbón activado (Hyman y Dupont, 2001).

Asimismo, la producción de artemisinina estuvo asociada positivamente con la biomasa de altamisa y negativamente con la concentración de artemisinina, encontrándose un porcentaje de artemisinina mayor (0,4%) en presencia de herbicida. Los resultados obtenidos frente a estas condiciones de estrés, alta densidad y pulverización del herbicida, se contraponen a lo hallado con otros tipos de estrés, ya que el porcentaje de artemisinina en hoja disminuyó desde 0,18 a 0,04 % en plantas de altamisa expuestas a un estrés hídrico (Charles *et al.*, 1993). Sin embargo, otros trabajos evidencian un incremento en el porcentaje de artemisinina ante un estrés por salinidad (Qian *et al.*, 2007), por déficit de agua (Marchese *et al.*, 2010) o por presencia de arsénico en el suelo (Rai *et al.*, 2011). Sólo para el 2006, se observó un efecto del herbicida sobre la acumulación de artemisinina en el carbón que podría asociarse a la disminución de la biomasa de altamisa en esas parcelas. De esta manera las interacciones con los factores del ambiente juegan un rol importante en la expresión de la alelopatía (Gershenzon, 1984). Por lo tanto, un factor de estrés puede influir tanto en la producción de los aleloquímicos de la planta emisora (altamisa) como modificar la respuesta, ya sea positiva, negativa o neutra sobre la especie receptora (soja) (Einhelling, 1996).

Existen numerosos trabajos que cuantifican el efecto de sesquiterpenos (*e.g.* artemisinina) provenientes de *A. annua* (Duke *et al.*, 1987; Lydon *et al.*, 1997; Mannan *et al.*, 2010) sobre diferentes especies de malezas y cultivos. Por ejemplo, son necesarios niveles de 50 y 30 ppm de artemisinina en el medio de cultivo para inhibir en un 50 % el crecimiento de plántulas de *Portulaca oleracea* L. y *Amaranthus blitum* L. (Bagchi *et al.*, 1997), mientras que tan sólo 10 µl de artemisinina se requieren en un medio de cultivo, para inhibir el crecimiento radical de plántulas de *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek

(Chen y Leather, 1990). Otras investigaciones realizadas por Lydon *et al.* (1997) evidencian una reducción de un 70 % de la biomasa aérea de *Amaranthus retroflexus* L. con 48 μmol de artemisinina por maceta. A diferencia de estas investigaciones, los resultados obtenidos en este capítulo acerca del efecto de la artemisinina sobre la nodulación y el rendimiento revelaron un efecto positivo de este compuesto sobre las variables medidas en el cultivo de soja, aún a altas densidades de la maleza (8 plantas por m^2). La diferencia de estos resultados con los hallados en la bibliografía podría deberse a que los experimentos fueron desarrollados en condiciones controladas y estos resultados no puedan ser extrapolados a las condiciones de campo (Inderjit y Weston, 2000). Por otro lado, la aplicación directa de un aleloquímico en un medio de cultivo, especialmente en los experimentos *in-vitro*, hacen que la disponibilidad de esa sustancia sea del 100 %, lo que raramente ocurre en condiciones ecológicas naturales (Kaur *et al.*, 2009).

La lixiviación de los aleloquímicos, especialmente la artemisinina, de las hojas e inflorescencias (Birkett *et al.*, 2001) de las plantas altamisa, a través de las precipitaciones (y el riego suplementario), el viento (Inderjit *et al.*, 2005) y los órganos caídos al suelo (Birkett *et al.*, 2001) quedó demostrada, dado que se pudo cuantificar el contenido de este compuesto adsorbido en el carbón activado de las parcelas experimentales. Sin embargo, el contenido de este compuesto en el suelo, como las demás determinaciones realizadas se asemejan a una fotografía que refleja la concentración estática de este compuesto en un determinado momento (madurez fisiológica de soja, R8, Fehr y Caviness, 1977), manifestando el balance entre las entradas y posibles salidas en ese momento (Weidenhamer, 2006) y no provee información acerca de las tasas de entradas o salidas al sistema edáfico. Es por ello, que deberían realizarse más esfuerzos para analizar la dinámica de los aleloquímicos sobre las interacciones competitivas, alelopáticas y mutualistas.

De acuerdo a Rice (1984) la interacción alelopática incluye tanto un efecto negativo como positivo, aunque otros autores prefieren reconocer a la alelopatía como un efecto negativo (Weidenhamer *et al.*, 1989; Callaway y Aschehoug, 2000). En base a la afirmación de Rice (1984), y a los resultados de este capítulo, se encontró un efecto neutro o positivo de la maleza alelopática altamisa a través de la producción de terpenos, precisamente, la artemisinina, sobre la nodulación y rendimiento del cultivo de soja, especialmente en el tratamiento sin carbón y sin herbicida. Estos resultados coinciden con las investigaciones de Mallik y Williams (2005), quienes observaron un efecto de estimulación sobre la nodulación y el rendimiento de plantas de soja cuando fueron incorporados al suelo residuos de la maleza alelopática *Solanum nigrum* L. Asimismo, el trabajo de Delabays *et al.*, (2008) es la primera evidencia del efecto de estimulación de la artemisinina, a bajas dosis (0,014 a 0,14 mg l^{-1}), sobre el crecimiento radical de *Solanum tuberosum*. Estos resultados se contraponen con los reportados previamente por otros autores (Duke *et al.* 1987; Lydon *et al.* 1997; Dayan *et al.* 1999) quienes observaron un efecto inhibitorio de la artemisinina sobre la soja y otras especies.

Hasta el presente, no existen evidencias acerca de cual es la mínima densidad de altamisa, en el que se afecta el crecimiento, la nodulación y el rendimiento del cultivo de soja, y menos aún, sobre la cantidad de aleloquímicos liberados por esta maleza alelopática, para generar un efecto positivo, negativo o neutro sobre este cultivo. Sumado a la complejidad, que un estrés biótico y abiótico (Einhelling, 1999), como el ambiente particular de un año y una localidad podrían cambiar dichos umbrales (Aldrich, 1987). También, la importancia de realizar estos experimentos a campo, hace

que los resultados obtenidos sean extrapolables a las condiciones habituales de manejo en la producción de soja.

Desde el punto de vista de manejo de malezas, los resultados presentados en este capítulo constituyen un importante avance en el entendimiento de las relaciones soja-altamisa y pueden ser extrapolados a las condiciones habituales de campo en Argentina. Es decir, que altamisa no representaría una pérdida significativa en el rendimiento de soja dentro del rango de densidades de altamisa exploradas (2 a 8 plantas m^{-2}) cuando son liberados al medio edáfico los aleloquímicos (parcelas C-) provenientes de la biomasa aérea. Sin embargo, hay que considerar que este tipo de respuesta podría variar en función de las interacciones entre el ambiente (*e.g.* fecha de siembra, variabilidad interanual, localidad, lote, tipo de suelo), el cultivo de soja (*e.g.* distintas variedades o grupos de madurez), la maleza (*e.g.* quimiotipos), diferentes tipos de estreses (bióticos y abióticos) que se generen durante la estación de crecimiento y el manejo del hombre (*e.g.* densidad, agroquímicos).

En resumen, en este capítulo se investigó de qué manera un aumento de la densidad de plantas de 2 a 8 plantas m^{-2} y una dosis subletal de glifosato, afectó la producción de los compuestos alelopáticos (aceite esencial y artemisinina) en la maleza y su acumulación (artemisinina) en el suelo, y cual fue el efecto sobre el cultivo de soja. Los resultados presentados dan sustento a los interrogantes que serán abordados en el capítulo siguiente: (i) ¿Existen diferencias en el efecto alelopático sobre la nodulación y en consecuencia el rendimiento de soja dependiendo de fuentes de aleloquímicos de altamisa (rastrotejo, biomasa verde, o artemisinina pura)? (ii) ¿Qué rol juega la calidad del suelo (en términos del contenido de microorganismos) en el tipo de respuesta de las plantas de soja?

3.5 CONCLUSIONES

A pesar de la complejidad de las múltiples interacciones y sus respuestas en el sistema cultivo-maleza en condiciones de campo y las dificultades para estudiarlas, se pudo cumplir con los objetivos propuestos en este capítulo y aportar nuevos conocimientos acerca del efecto de las interacciones competitivas y alelopáticas, sobre la producción de aleloquímicos de altamisa y su relación con el crecimiento y la nodulación del cultivo de soja en dicho sistema.

En este capítulo surgen algunos aspectos a destacar:

(i) Existe una notable variabilidad en la producción de aceite esencial en respuesta a los tratamientos de densidad y herbicida.

(ii) Algunos terpenos (epoxi-mirceno y alfa-canfolenal) fueron más sensibles a los tratamientos impuestos.

(iii) El aumento de la densidad de altamisa produce un incremento en la artemisinina adsorbida en el carbón activado.

(iv) Existe un efecto neutro o positivo de la maleza alelopática altamisa, a través de la producción de los aleloquímicos, sobre la nodulación y el rendimiento de soja.

CAPITULO 4

Fuentes de artemisinina y tipos de suelos: efecto sobre la nodulación y el
rendimiento de soja

4.1 INTRODUCCIÓN

El tipo de residuo u órgano de la planta que actúa como fuente de aleloquímicos y que ingresa al medio edáfico, condiciona la proporción relativa de los metabolitos secundarios disponibles, dependiendo de la naturaleza de la fuente (*e.g* biomasa verde, biomasa seca) (Yulin *et al.*, 2008).

La respuesta a los aleloquímicos de la especie receptora dependerá no sólo de la tasa de liberación, de la acumulación y persistencia de estos compuestos químicos en el ambiente (Batish *et al.*, 2007), sino además, del tipo de metabolito secundario y de las condiciones biológicas, físicas y químicas del sustrato, que juegan un rol importante en determinar la persistencia de los aleloquímicos en el suelo (Chaves Lobón *et al.*, 2002; Popa *et al.*, 2008).

Los microorganismos del suelo son, en gran parte, los responsables de cuan disponibles se encuentran los compuestos liberados desde los tejidos de las plantas, ya que utilizan estos residuos, por ejemplo como fuente de C y energía (Vokou *et al.*, 1984). Este metabolismo será diferente de acuerdo al tipo de suelo debido a las diferencias de microflora presentes en él (Inderjit, 2005) y a las diferentes fuentes de aleloquímicos u órganos (*e.g* hojas, tallos) (Jafari *et al.*, 2011). Por ejemplo, Dudai *et al.* (2009) evidenciaron que la cantidad y las proporciones relativas de los aleloquímicos en el suelo, provenientes de hojas de *Micromeria fruticosa* (L.) Druce, difirieron significativamente según el tipo de sustrato utilizado (suelo arcilloso o arenoso), y en consecuencia se observó una respuesta diferencial en el crecimiento de plantas de trigo. Por otro lado, las investigaciones de Kaur *et al.* (2009) demostraron que se requiere una mayor concentración del aleloquímico m-tirosina, proveniente de *Festuca rubra* L. para provocar fitotoxicidad (disminución del crecimiento radical) en plantas de *Lactuca sativa* (L.), *Phalaris minor* (Retz.) y *Bambusa arundinacea* (Retz.) Willd cuando las plantas crecían en un sustrato no esterilizado comparado con los experimentos realizados *in vitro* (en cajas de Petri) o con un sustrato estéril donde la disponibilidad del aleloquímicos era mayor.

En este sentido, la adsorción de los aleloquímicos en las partículas del suelo, la descomposición química y/o la degradación de estos compuestos a través de la microflora del suelo son los principales mecanismos que intervienen en la fitotoxicidad de estos compuestos influenciando así, el crecimiento de las plantas receptoras (Inderjit, 2001).

El origen de los residuos de altamisa impactan sobre la concentración de los aleloquímicos que se aportan al suelo, pero la descomposición diferencial de los tejidos en el suelo y el tipo de sustrato podrían modular la liberación y descomposición y actividad de los aleloquímicos en altamisa. Esto podría provocar variación en el modo en que se generan efectos sobre el crecimiento, la nodulación, y en consecuencia el rendimiento en las plantas de soja.

Varios estudios demuestran que los residuos provenientes de malezas (Batish *et al.*, 2007) como altamisa (Duke *et al.*, 1987), liberan fitotoxinas al suelo, y pueden afectar el crecimiento (Lydon *et al.*, 1997), la nodulación y la fijación biológica del N (Rice, 1984) del cultivo de soja. Por ejemplo, dosis crecientes de residuos de *Chenopodium murale* afectan la nodulación y en consecuencia la fijación biológica del N (Batish *et al.*, 2007) en especies de leguminosas.

Por lo tanto, el objetivo es determinar el efecto de distintas fuentes de artemisinina (biomasa de altamisa verde, seca y artemisinina pura) sobre el crecimiento,

nodulación y rendimiento en plantas de soja creciendo en dos tipos de sustratos: arcilloso y arenoso.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Sitio experimental y diseño de los tratamientos

Durante la campaña 2008 se realizó un experimento en macetas en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (34° 37'S, 58° 20'O). Las condiciones meteorológicas (temperatura y precipitación) fueron registradas de la Estación Meteorológica Villa Ortúzar (34° 35'S, 58° 25'O) (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1 Temperaturas máximas y mínimas (°C) y precipitaciones (mm) registradas durante los meses del experimento en el año 2008 por la Estación Meteorológica Villa Ortúzar.

Meses	Experimento 3		
	Temperatura		Precipitaciones acumuladas mm
	°C		
	Máxima	Mínima	
Enero	28,7	21,3	59,4
Febrero	29,9	20,7	91,7
Marzo	26,6	17,6	123,4
Abril	24,9	13,1	39,4
Mayo	21,6	9,4	7,7

El experimento tuvo un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial con 5 repeticiones. Los 8 tratamientos resultaron de la combinación factorial de 4 niveles de fuente de aleloquímicos de altamisa (*BS*, biomasa seca; *BV*, biomasa verde de altamisa; *A*, Artemisinina pura y *C*, Control, sin agregado de ninguna fuente) y 2 niveles de sustrato (*S_{ARCILLOSO}*, suelo de textura arcillosa y *S_{ARENOSO}*, suelo de textura franca arenosa).

Fuentes de aleloquímicos de altamisa

El residuo seco de plantas de altamisa se recolectó manualmente de las parcelas *D5*, *C-*, *H-* (monocultura de altamisa, sin carbón y sin herbicida), provenientes del experimento a campo del año anterior (Exp. 2, 2007). Estas parcelas se mantuvieron de un año a otro sin cultivar con el objetivo de recolectar el material vegetal senescente y verde al año siguiente. La cantidad de residuo seco aplicado en las macetas se estimó de acuerdo al volumen de biomasa acumulada sobre el perfil del suelo del experimento a campo (Exp. 2, 2007), de manera tal de “imitar” las condiciones de cantidad y calidad de biomasa de altamisa (Cuadro 4.2). Asimismo, el residuo verde, provino de las plantas en pie de altamisa de las mismas

parcelas experimentales. La cantidad de altamisa verde aplicada se determinó de acuerdo a la proporción del residuo seco determinado corregida por el contenido de humedad. En las plantas de altamisa, se separó la biomasa de las hojas e inflorescencias (H e I), de las del tallo principal. La porción de la biomasa de H e I fue trozada hasta lograr fracciones de 20 cm de largo aproximadamente.

Ambos residuos se incorporaron manualmente en los primeros 7 cm del suelo de las macetas (unidades experimentales) para imitar las condiciones habituales de remoción de manejo a campo. El contenido de artemisinina de los residuos se determinó según la metodología provista por Qian *et al.* (2005) (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2 Cantidad de residuos aplicados y nivel de artemisinina en hoja (%) estimado según los tratamientos de la fuente de altamisa.

	Altamisa seca	Altamisa verde	Artemisinina ^b	Control
Residuo (g ^a maceta ⁻¹)	40	40	0,0058	-
Nivel de artemisinina (%)	0,49 ^c	0,45 ^c	98	-

^a peso expresado sobre base seca.

^b Sigma-Aldrich, 98% (St. Louis, Missouri, USA)

^c Determinación sobre el residuo seco y verde según Metodología Qian *et al.*, 2005.

Con el fin de lograr una disponibilidad gradual de la artemisina en el sustrato de las macetas del tratamiento A, la dosis de este compuesto se particionó (Delabays *et al.*, 2008) en cuatro dosis porcentuales de 0,15; 0,35; 0,25 y 0,25 del total. Estas dosis se aplicaron semanalmente junto con el riego. En el tratamiento control, no se aplicó ninguna fuente de artemisinina ni de biomasa.

Tipos de sustratos

Para generar distintas calidades de suelo como nivel *S_{ARCILLOSO}* se utilizó el suelo proveniente del campo experimental aledaño a los experimentos realizados en el 2006 y 2007, que no tuviera historia de altamisa, y por lo tanto, pudiera afectar la respuesta en las plantas de soja. Las macetas (23 l) del sustrato arcilloso, se llenaron con este suelo, clasificado como un Argiudol vértico (Taxonomía del USDA, 1999) compuesto por una relación de arena: arcilla: limo, 10:35:55. Mientras que el suelo del nivel *S_{ARENOSO}* se realizó con una mezcla del suelo descripto y arena, en una proporción 50/50 (suelo/arena, respectivamente). Previo a la siembra de la soja, se determinaron las propiedades químicas y físicas de ambos sustratos utilizados (Anexo 4.1 a y b). A los fines de este capítulo se hará referencia al tratamiento *S_{ARCILLOSO}* a aquel sustrato sin el agregado de arena, y al *S_{ARENOSO}* suelo en el que se agregó arena, las clases texturales de ambos sustratos se presentan en el Anexo 4.1 b.

El 5 de enero de 2008 se sembraron 5 semillas de soja por maceta (Grupo de madurez IV, DM 4800 resistente a glifosato), previamente inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* (10⁹ UFC/ g inoculante), conteniendo los diferentes tratamientos de altamisa y sustrato. En el momento de la emergencia de soja (VE, Fehr y Caviness, 1977), se raleó dejando una planta por maceta. Durante todo el ciclo del

experimento las plantas se regaron periódicamente con el objetivo de mantener el suelo cerca de capacidad de campo durante la estación de crecimiento. Con el objetivo de prevenir la incidencia de plagas se aplicó un insecticida (Clorpirifós, 48 % *i.a.*/l, dosis equivalente a 0,40 l/ha) en el estado de V2 de soja (Fehr y Caviness, 1977).

4.2.2 Determinaciones

En el estado vegetativo (V4) y en floración de soja (R1; Fehr y Caviness, 1977), a fin de evaluar la biomasa aérea total acumulada, se cosechó manualmente la biomasa aérea total de las plantas de soja y se extrajeron muestras de raíces con un cilindro (0,25 m x 0,18 m de diámetro) conteniendo las raíces primarias y secundarias y los nódulos, en 5 unidades experimentales (maceta) de cada tratamiento y para cada estado ontogénico. Las muestras de raíces se lavaron en una zaranda con malla de 1 mm de diámetro, a fin de evaluar: biomasa radical, número y peso de nódulos y el peso específico de nódulos (peso de nódulo/nódulo).

En madurez fisiológica (R8; Fehr y Caviness, 1977) se cosechó la biomasa aérea total de cada unidad experimental, determinándose la biomasa aérea total acumulada y el rendimiento en grano.

El peso seco de todas las variables se determinó colocando las muestras en estufa a 68 °C de temperatura hasta alcanzar su peso constante.

Dado que se contó con baja disponibilidad del aleloquímico artemisinina, se evaluó el tratamiento A (artemisinina pura) en las plantas de soja destinadas a la cosecha de los estadios ontogénicos V4 y R8 (Fehr y Caviness, 1977).

4.2.3 Análisis estadístico

La biomasa aérea de soja, el número y peso de nódulos, el peso específico y el rendimiento se analizaron a través de un ANVA mediante el programa STADISTICA versión 7 (StatSoft, Inc., 2004). La medias de los tratamientos se separaron a través del Test de Tukey a un nivel de significancia de $p < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Nodulación y crecimiento radical de la soja

En ambos estados ontogénicos de soja (V4 y R1), no se observaron interacciones entre los factores fuente de altamisa y tipo de sustrato sobre la biomasa y la biomasa de nódulos (Cuadro 4.3, Fig. 4.1). Solamente, en el estado de V4, la biomasa de nódulos fue significativamente mayor cuando las plantas de soja crecieron en el *S_{ARENOSO}* (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3 Número y biomasa de nódulos de soja para el factor fuente de altamisa (*FA*), sustrato (*S*) y su interacción. Valores medios en el estado ontogénico de 4 hojas (V4) y floración (R1) de soja (Fehr y Caviness, 1977).

Factor	Nivel*	V4		R1	
		Número de nódulos	Biomasa de nódulos	Número de nódulos	Biomasa nódulos
		(N maceta ⁻¹)	(g maceta ⁻¹)	(N maceta ⁻¹)	(g maceta ⁻¹)
<i>FA</i>	<i>C</i>	47,86 (12,95)	0,21 (0,04)	46,10 (8,31) b	0,30 (0,05)
	<i>BS</i>	44,25 (3,71)	0,21 (0,03)	81,56 (10,26) a	0,43 (0,06)
	<i>BV</i>	36,44 (6,92)	0,17 (0,04)	51,44 (8,57) b	0,31 (0,05)
p=		0,47	0,46	0,03	0,19
<i>S</i>	<i>S_{ARCILLOSO}</i>	35,92 (4,76)	0,14 (0,03) b	55,31 (8,62)	0,32 (0,05)
	<i>S_{ARENOSO}</i>	48,83 (7,70)	0,24 (0,03) a	62,60 (8,14)	0,36 (0,04)
p=		0,14	0,01	0,57	0,50
<i>FA x S</i>	<i>C x S_{ARCILLOSO}</i>	37,00 (7,71)	0,15 (0,04)	42,40 (13,26)	0,26 (0,06)
	<i>C x S_{ARENOSO}</i>	62,33 (29,54)	0,28 (0,06)	49,80 (11,32)	0,33 (0,07)
	<i>BS x S_{ARCILLOSO}</i>	44,50 (6,99)	0,19 (0,04)	82,25 (10,23)	0,44 (0,10)
	<i>BS x S_{ARENOSO}</i>	44,00 (3,92)	0,22 (0,04)	81,00 (17,78)	0,42 (0,10)
	<i>BV x S_{ARCILLOSO}</i>	26,25 (9,22)	0,09 (0,05)	44,50 (14,72)	0,26 (0,09)
	<i>BV x S_{ARENOSO}</i>	44,60 (9,16)	0,24 (0,05)	57,00 (10,83)	0,34 (0,05)
p=		0,53	0,36	0,88	0,78

Entre paréntesis se encuentran los valores del error estándar de la media.

*Datos del tratamiento A no registrados.

Asimismo, la biomasa ($p=0,46$) y el número de nódulos ($p=0,47$) se mostraron invariantes frente a los tratamientos *FA* (fuentes de altamisa) para el mismo estado de desarrollo de las plantas de soja (V4). Sin embargo, en el estado de floración (R1), la biomasa seca de altamisa (*BS*) generó un mayor número de nódulos ($p=0,03$) con respecto al control y a *BV*. Del mismo modo que en la evaluación temprana de la nodulación (V4), la biomasa de nódulos en floración no se modificó ni por la fuente de altamisa, y en este caso tampoco por el sustrato utilizado.

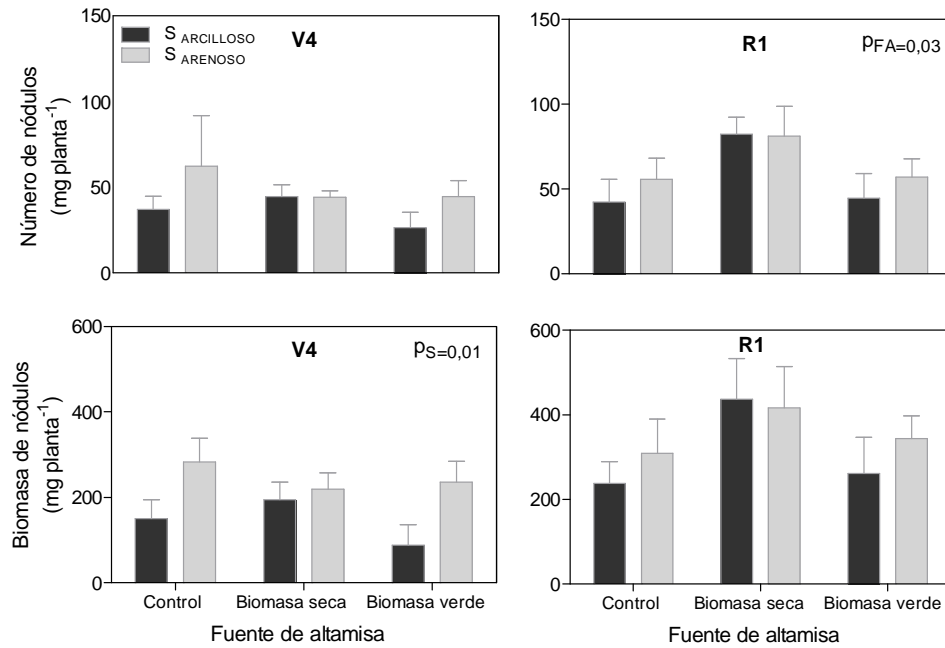


Figura 4.1 Número y biomasa de nódulos según las fuentes de altamisa y el tipo de sustrato en los estados ontogénicos V4 y R1 de soja. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

La mayor biomasa específica de los nódulos en V4 se encontró para el $S_{ARENOSO}$, independientemente de la fuente de altamisa ($p=0,01$), no difiriendo entre las fuentes de altamisa ($p=0,72$) ni en la interacción $FA \times S$ ($p=0,45$). Sin embargo en la floración de la soja (R1) no hubo efecto de los tratamientos sobre esta variable (Fig. 4.2).

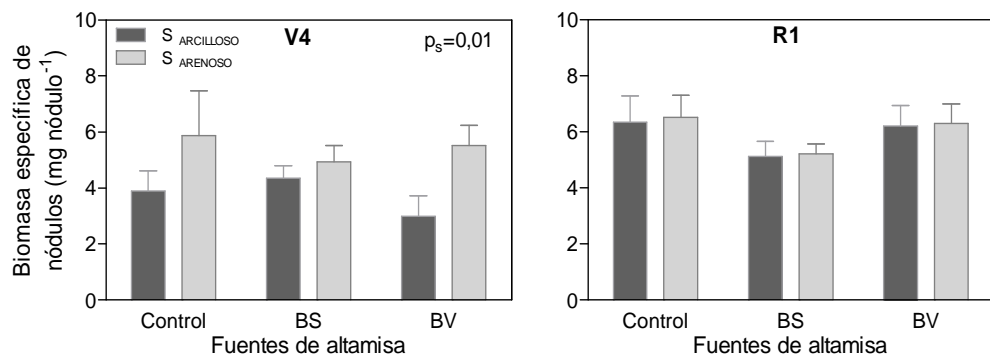


Figura 4.2 Biomasa específica de nódulos (mg nódulo⁻¹) según la fuente de altamisa y el sustrato para los estados ontogénicos V4 y R1 de soja. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

La interacción de los factores $FA \times S$ sobre la biomasa radical en V4 y R1 no fue significativa ($p=0,08$ y $p=0,72$, respectivamente). En el estado ontogénico V4, la biomasa radical por planta no difirió significativamente según las fuentes de altamisa evaluadas. Sin embargo, se observó un incremento del 27 % en el crecimiento radical ($p<0,001$) en el sustrato arcilloso (valor promedio de 1,51 vs 1,10 g planta⁻¹ en el

*S*_{ARCILLOSO} vs *S*_{ARENOSO}, respectivamente, Fig.4.3). En la floración de soja, la biomasa radical de soja fue significativamente mayor para el tratamiento *BS* (35 %), en relación a los tratamientos control y de *BV* ($p=0,02$), mientras que la biomasa de raíces disminuyó significativamente un 31 % cuando las plantas crecieron en el sustrato con arena ($p<0,001$) (valor promedio de 2,77 vs 2,28 g planta⁻¹ en el *S*_{ARCILLOSO} vs *S*_{ARENOSO}, respectivamente, Fig.4.3).

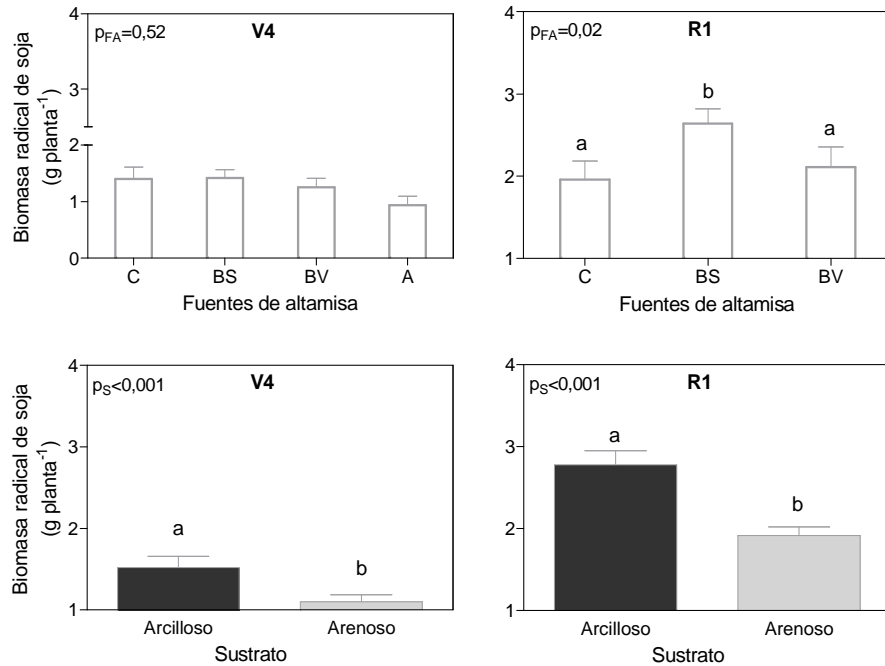


Figura 4.3 Biomasa radical de soja (g planta⁻¹) según las distintas fuentes de altamisa (C, control; BS, biomasa seca, BV, biomasa viva, y A, artemisinina pura) y suelos en V4 y R1 de soja. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey al nivel de significancia de $p<0,05$. Las interacciones $FA \times S$ no fueron significativas para la biomasa radical de soja en V4 ($p=0,08$) y R1 ($p=0,72$). La biomasa radical del tratamiento A en R1 no fue evaluada.

4.3.2 Biomasa de soja

En los estados ontogénicos de 4 hojas (V4) y floración (R1) se encontró una interacción entre la fuente de altamisa y el sustrato sobre la biomasa aérea de soja ($p=0,02$ para ambos estados ontogénicos, Cuadro 4.4, Fig. 4.4). En V4, la biomasa de soja de los tratamientos BV, A y C fue significativamente mayor en las plantas de soja creciendo en el sustrato arcilloso. La biomasa aérea de soja en los tratamientos con el agregado de rastrojo seco de altamisa (BS) no se modificó en los dos tipos de sustratos utilizados.

En la madurez de la soja (R8), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la biomasa de las plantas de soja (Cuadro 4.4, Fig. 4.4).

Cuadro 4.4 Biomasa aérea total de soja para los factores de fuentes de altamisa (*FA*), Sustrato (*S*) y su interacción. Valores medios en el estado ontogénico de 4 hojas (*V4*), floración (*R1*) y madurez fisiológica (*R8*) de soja (Fehr y Caviness, 1977).

		V4		R1 ¹		R8	
		Biomasa aérea total					
Factor	Nivel	(g maceta ⁻¹)		(g maceta ⁻¹)		(g maceta ⁻¹)	
FA	C	13,30	(1,56)	53,67	(4,35)	65,16	(3,57)
	BS	15,00	(0,86)	60,01	(2,39)	68,20	(3,77)
	BV	12,36	(0,99)	54,75	(2,51)	63,32	(4,26)
	A	13,95	(2,32)			69,49	(3,29)
p=		0,16		0,57		0,81	
S	S _{ARCILLOSO}	16,00	(0,94)	a	59,19	(2,88)	70,40 (3,07)
	S _{ARENOSO}	11,29	(0,44)	b	53,23	(2,62)	62,98 (2,01)
p=		<0,0001		0,21		0,08	
FA x S	C x S _{ARCILLOSO}	17,99	(1,81)	a	63,73	(6,12)	65,65 (7,05)
	C x S _{ARENOSO}	10,49	(0,78)	b	46,96	(4,40)	64,67 (3,12)
	BS x S _{ARCILLOSO}	17,24	(0,60)	a	55,01	(3,83)	72,21 (7,17)
	BS x S _{ARENOSO}	12,76	(0,70)	a	63,76	(1,30)	64,20 (2,13)
	BV x S _{ARCILLOSO}	12,98	(1,92)	a	57,78	(4,42)	71,91 (0,58)
	BV x S _{ARENOSO}	11,73	(0,73)	b	52,32	(2,78)	58,16 (5,74)
	A x S _{ARCILLOSO}	18,47	(2,51)	a			72,24 (6,17)
	A x S _{ARENOSO}	9,43	(0,51)	b			66,75 (2,90)
p=		0,02		0,02 ²		0,70	

Letras dentro de cada columna significan diferencias significativas entre los tratamientos según el test de Tukey al nivel de $p < 0,05$. Entre paréntesis se encuentran los valores de error estándar.

¹ En el estado de R1 no se evaluó el tratamiento de artemisinina.

² Las medias de los tratamientos no se separaron mediante el Test de Tukey a un nivel de significancia de $p < 0,05$.

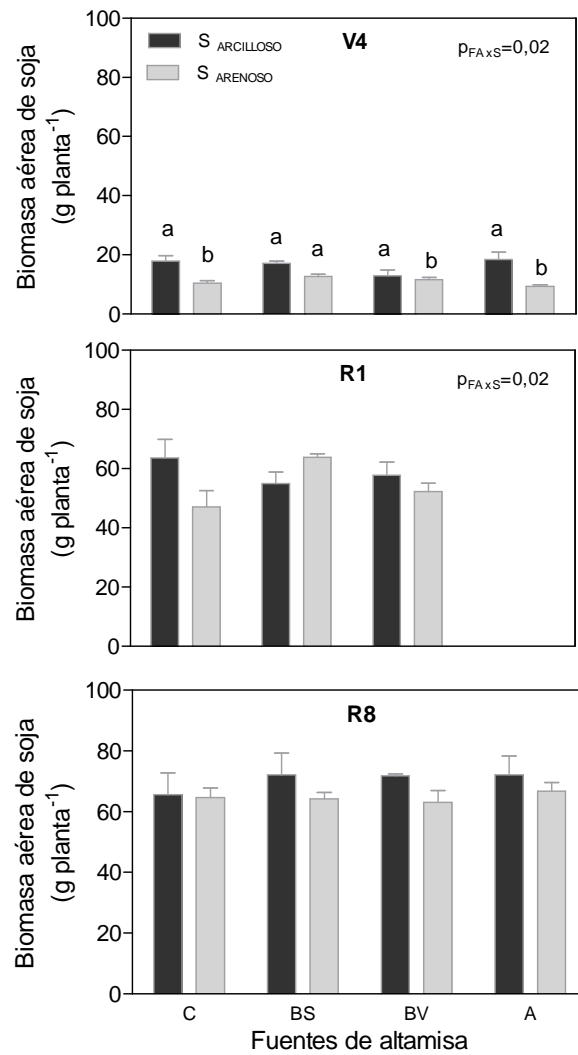


Figura 4.4 Biomasa aérea de soja según la fuente de altamisa y el sustrato en el estado ontogénico de 4 hojas (V4), floración (R1) y madurez fisiológica (R8) de soja (Fehr y Caviness, 1977). El tratamiento A no se evaluó en floración. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. El test de Tukey para la biomasa de soja en R1, no fue significativo al nivel de significancia $p < 0,05$.

4.3.3 Rendimiento de soja

El rendimiento en grano se modificó según la fuente de altamisa y tipo de sustrato en el que crecieron las plantas de soja ($p = 0,02$; Fig. 4.5). En el sustrato arcilloso el rendimiento de soja fue comparativamente mayor en presencia de la BS, BV y A con respecto al sustrato arenoso (Fig. 4.5).

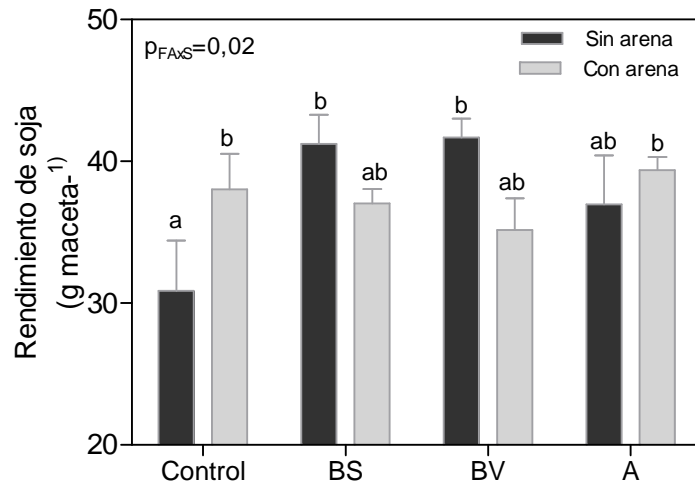


Figura 4.5 Rendimiento de soja (g maceta^{-1}) según la fuente de altamisa y sustrato a madurez fisiológica (R8, Fehr y Caviness, 1977). Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey al nivel de significancia de $p < 0,05$.

4.3.4 Relación entre el número y la biomasa de nódulos y el rendimiento de soja

A medida que se incrementó la biomasa y el número de nódulos el rendimiento tendió a aumentar considerando todos los tratamientos evaluados excepto el tratamiento *BV* de las plantas que crecieron en el sustrato arcilloso (Fig. 4.6). Es destacable que en *BS* y el $S_{\text{ARCILLOSO}}$ se logró el máximo rendimiento (35 % mayor, con respecto al control) con el mínimo de peso y número de nódulos. Estos efectos no se observaron en el S_{ARENOSO} donde no hubo diferencias en el rendimiento para los tratamientos de fuentes de altamisa evaluados.

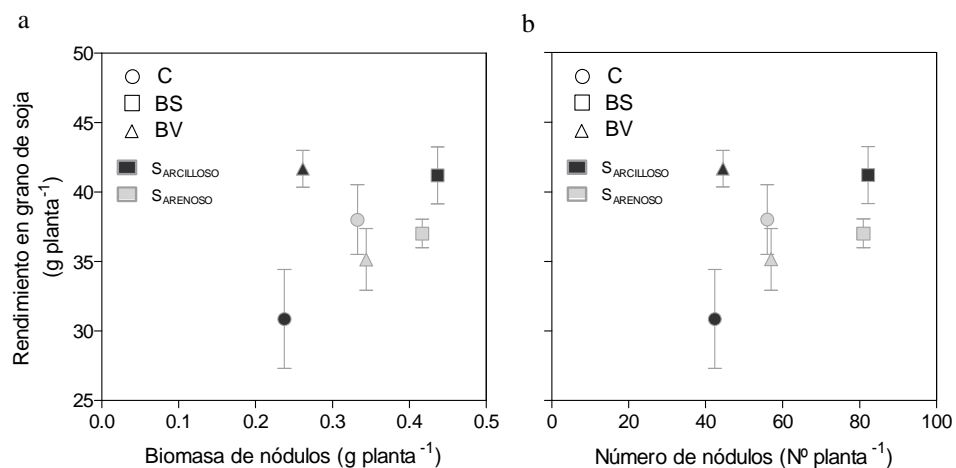


Figura 4.6 Relación entre el rendimiento en grano y la biomasa (a) y número (b) de nódulos por planta de soja. La biomasa y número de nódulos corresponde al estado ontogénico de R1 (floración, Fehr y Caviness, 1977). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

4.4 DISCUSION

Los resultados presentados muestran que las distintas fuentes de artemisinina (biomasa de altamisa seca y verde y artemisinina pura) incorporadas al suelo afectaron diferencialmente la biomasa aérea acumulada sólo en los estadios más tempranos de soja (V4) y el rendimiento en grano, dependiendo del tipo de suelo en el que crecieron las plantas.

En relación a la nodulación temprana (V4), el número de nódulos no presentó cambios según las fuentes de aleloquímicos de altamisa ni del tipo de suelo. Sin embargo, la biomasa de nódulos (total por planta y específica) fue particularmente dependiente de que el suelo fuese arenoso o arcilloso. La mayor biomasa de nódulos en el *S_{ARENOSO}* podría deberse, por un lado, a las diferencias en la descomposición de las hojas de altamisa en ambos tipos de suelo y, por lo tanto, a la cantidad de aleloquímicos acumulados en el suelo (Rice, 1984; Dudai *et al.*, 2009) en los tratamientos *BS* y *BV*. Este proceso podría estar facilitado por los microorganismos del suelo, que actúan como un componente responsable de la disponibilidad de los aleloquímicos (Vokou *et al.*, 1984; Inderjit, 2005; Kaur *et al.*, 2009). Por el otro, podrían deberse a las diferencias en la fertilidad inicial del suelo dado que la nodulación es también afectada por la cantidad de nitrógeno (Sodek y Silva, 1996) y fósforo (Tsvetkova y Georgiev, 2003) disponibles en el suelo. No es de esperar que el pH de los sustratos haya influido en las respuestas observadas (Wardle *et al.*, 1992), dado que los dos tipos de suelos presentaron similar pH (6,4 y 6,5 para el *S_{ARCILLOSO}* y *S_{ARENOSO}*, respectivamente).

Por el contrario, en floración (R1) se observó un mayor número de nódulos en el tratamiento *BS*, sin cambios en la biomasa de los nódulos (valor por planta y promedio). Estos resultados coinciden con el trabajo de Heckman y Kluchinski (1995) quienes reportaron un incremento en el número de nódulos del 40 % con respecto al control, sin modificaciones en la biomasa de los nódulos de soja, cuando se incorporan al suelo diferentes fuentes de aleloquímicos provenientes de las hojas de *Quercus rubra* L., *Juglans nigra* L. y *Secale cereale* L., entre otros. Sin embargo, estos resultados se contraponen con los descriptos por otros autores, quienes observaron un efecto inhibitor sobre la nodulación en especies leguminosas cuando se incorporan al suelo fuentes de aleloquímicos (Batish *et al.*, 2007; Batlang y Shushu, 2007). Los experimentos de Batish *et al.* (2007) demostraron que el número de nódulos de *Pisum sativum* se redujo cuando las plantas crecieron en un suelo conteniendo residuos de *Chenopodium murale* (entre 5 a 10 µg de suelo) mientras que tanto la biomasa como el número de nódulos fue nulo con 20 µg de éstos residuos en el suelo. Por otro lado, Batlang y Shushu (2007) documentaron un efecto depresor sobre el número de nódulos de *Vigna subterranea* (L.) Verdc. cuando se incorporaron al suelo residuos provenientes de *Helianthus annuus* ricos en terpenoides, particularmente sesquiterpenos (Macias *et al.*, 2002). Si bien, estos trabajos utilizaron a las hojas como fuente de aleloquímicos, cabe destacar que los metabolitos secundarios involucrados, fueron diferentes a los del presente estudio, a excepción de los aleloquímicos reportados por Batlang y Shushu (2007), cuyos grupos funcionales y responsable de las respuestas alelopáticas, son análogos a los aleloquímicos provenientes de altamisa. El incremento notorio en el número de nódulos de soja del tratamiento *BS*, podría estar asociado al mayor crecimiento radical (35 %) de las plantas de soja. Estos resultados coinciden con el trabajo de Delabays *et al.* (2008), quienes encontraron por primera vez en altamisa, un efecto promotor cercano al 20 % sobre el crecimiento radical de *Solanum tuberosum*, cuando se incorporó al suelo residuos de altamisa (0,1 ml/l). Por otro lado, la composición del residuo *BS* contiene una relación C:N más alta en relación a la *BV*

(Jafari *et al.*, 2011). Esta mayor relación C:N en el suelo produciría la inmovilización del N del suelo, favoreciendo la simbiosis y por lo tanto la nodulación (Perticari *et al.*, 2003).

Como fuera demostrado en los experimentos a campo (Capítulos 2 y 3) se encontró un efecto positivo de los aleloquímicos provenientes de la biomasa aérea de las plantas de altamisa sobre la nodulación de soja, particularmente sobre el tamaño específico del nódulo. Este efecto positivo en la soja estuvo asociado a una mayor cantidad de artemisinina acumulada en el perfil de suelo de las parcelas experimentales (Capítulo 3). En macetas, se observó el mismo efecto positivo sobre la nodulación, especialmente en el *S_{ARCILLOSO}* (Capítulo 4) que es el mismo suelo de los experimentos a campo (Capítulos 2 y 3). Esta similitud entre lo observado a escala de campo y de maceta no coincide totalmente con los resultados reportados por otros autores. Por ejemplo, Batlang y Shushu (2007) observaron en experimentos a campo, que la nodulación de *Vigna subterranea*, no se afectó cuando los aleloquímicos provenían de plantas de *Helianthus annuus* compitiendo con el cultivo. Por el contrario, en experimentos en macetas, donde los aleloquímicos de girasol se incorporaron al sustrato, el número de nódulos resultó drásticamente afectado. Sin embargo, cabe señalar que el sustrato utilizado en este último experimento, estuvo compuesto por una relación: residuo de hoja:suelo, 50:50 y 75:25 (peso:peso), siendo una cantidad excesivamente elevada para las condiciones habituales de campo. Estos resultados hacen pensar, por un lado, que aún testeando el efecto de una fuente de aleloquímicos en una misma especie rectora, las condiciones ambientales juegan un rol importante en la interacción alelopática. Y por el otro, que el cambio en la escala de abordaje en el estudio de esta interacción no supone que los resultados puedan ocurrir en la misma dirección.

La fijación biológica de N en soja es un proceso dinámico a lo largo de la ontogenia de la planta (Baca *et al.*, 2000; Maddonni *et al.*, 2003). Al comienzo del cultivo hasta R3 la fijación es escasa y lenta, creciendo abruptamente hasta R5/R6 para disminuir y luego anularse a partir de la competencia de los fotoasimilados durante el llenado de los granos en soja (parte del período crítico en soja). Las diferencias observadas entre los tratamientos de altamisa y sustrato para la biomasa aérea en los primeros estadios de soja (V4), podrían asociarse por un lado, a las diferencias de los aportes iniciales de N en los dos tipos de sustratos, y no al N aportado por la fijación biológica. Por el otro, la mayor biomasa aérea en el tratamiento *BS*, independientemente del sustrato en el que crecieron las plantas, podría relacionarse con el mayor crecimiento radical (Delabays *et al.*, 2008) debido a la presencia de los aleloquímicos en este tratamiento. A diferencia de lo reportado por Lydon *et al.* (1997), la falta de significancia en las biomásas aéreas de los estados avanzados de las plantas de soja (R1 y R8) probablemente estén asociados a que tanto al N acumulado en planta como al N aportado por la fijación biológica, no sean limitantes para la producción de biomasa en estos estadios reproductivos. Sin embargo, las diferencias observadas en el rendimiento en grano, estén asociadas a que en este momento el N sea un recurso limitante, y esta fuente de N sea abastecida tanto por el N absorbido durante su crecimiento de la planta, como por la fijación biológica del N. Esta última fuente de N, podría variar como respuesta a las diferentes fuentes de altamisa incorporadas en el suelo (Rice, 1984) y a los cambios asociados por parte de los aleloquímicos sobre las bacterias fijadoras de N tal como lo encontrado por Chouliaras *et al.* (2007), pero con aleloquímicos provenientes de hojas de *Ocimum basilicum* L. Asimismo, es destacable que el rendimiento resultó mayor para los tratamientos *BS* y *BV* con el *S_{ARCILLOSO}* con respecto a su control. Este efecto positivo sobre el rendimiento en el tratamiento *BS* y *S_{ARCILLOSO}*

podría estar asociado por un lado, al mayor crecimiento radical observado y, por el otro, a un incremento cercano al 76 % en el número de nódulos.

Existió una tendencia positiva de incremento del rendimiento a medida que se incrementó la biomasa o el número de nódulos para todos los tratamientos, excepto para *BV* con *S_{ARCILLOSO}*. No obstante, en el tratamiento en *BV* el rendimiento fue similar al del *BS* en el sustrato arcilloso, a pesar de que el número y la biomasa de nódulos se redujeron casi a la mitad. Estas diferencias, podrían explicarse a través de cambios en la microflora del suelo (Indejit, 2001; 2005), dados por la incorporación de la biomasa verde de altamisa que posee una menor relación C:N. Esto podría retrasar la simbiosis debido a que hay aportes de N por mineralización y por lo tanto un limitado suplemento de C hacia el nódulo (Perticari *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de estas diferencias halladas en el número y biomasa de nódulos en ambos tratamientos, la biomasa específica de los nódulos en el *S_{ARCILLOSO}* tendió a ser mayor en *BV* con respecto a *BS*. Esto podría deberse a las diferencias en la composición de aleloquímicos provenientes de ambas fuentes de altamisa (*BS* vs *BV*). A pesar de que el contenido de artemisinina fue similar en ambas fuentes, otros aleloquímicos podrían intervenir en esta respuesta (Lydon *et al.*, 1997; Delabays *et al.*, 2008). Por otro lado, el mayor rendimiento observado en el *S_{ARCILLOSO}* en comparación con el suelo arenoso, podría deberse a la mayor cantidad de aleloquímicos adsorbidos en el sustrato arcilloso, dado el mayor contenido de arcilla que actúa como adsorbente (Dudai *et al.*, 2009), y por lo tanto, los aleloquímicos podrían estar menos disponibles para las plantas.

A pesar de los numerosos trabajos que evidencian el efecto inhibitorio de residuos provenientes de hojas de altamisa (Duke *et al.*, 1987; Lydon *et al.*, 1997) los resultados provistos en este capítulo evidencian un efecto neutro o positivo de las distintas fuentes de altamisa con respecto al control. Si bien la alelopatía puede comprender las interacciones tanto de estimulación como de inhibición sobre las especies que lo perciben (Rice, 1984), son escasos los estudios que evidencian el efecto positivo de la alelopatía sobre plantas o microorganismos (Mallik y Tesfai, 1987; 1990; Mallik y Williams, 2005). Aunque el modo de acción del aleloquímico artemisinina aún es desconocido (Duke y Dayan, 2006; Delabays *et al.*, 2008) el efecto alelopático observado de la artemisinina y de otros aleloquímicos provenientes de altamisa, jugarían un rol ecológico bajo condiciones de campo. La artemisinina es una sustancia bastante estable en suelo, permaneciendo entre 56 (Lheureux, 2001) a 70 días (Delabays *et al.*, 2008), cuando se incorporan las hojas verdes de altamisa en el suelo o por muchas semanas, cuando se trata de hojas secas (Simonnet *et al.*, 2001). En estos sistemas, la altamisa funcionaría como una maleza alelopática competidora sobre especies de malezas, sin afectar el cultivo de soja, dentro del rango de densidades (Capítulos 2 y 3) y biomásas (Capítulo 4) evaluados.

En el experimento del presente capítulo, el suelo utilizado no se esterilizó dada la importancia de los microorganismos del suelo en detoxificar o magnificar la fitotoxicidad de los aleloquímicos que ingresan al ambiente edáfico. De esta manera se logró detectar la actividad alelopática sobre las especies receptoras (Inderjit, 2005). Un ejemplo del efecto detoxificante de los microorganismos sobre los aleloquímicos del suelo, lo constituyen las investigaciones realizadas por Kaur *et al.* (2009), quienes demostraron que el crecimiento radical en *Bambusa arundinacea* no se afectó ante incrementos de un aleloquímico (de 0 a 136 μ de m-tirosina/g de suelo) en un suelo sin esterilizar, mientras que el crecimiento de las raíces en altas dosis (136 μ /g) se redujo en un 80 % cuando el suelo fue esterilizado. En cuanto al efecto magnificador, Inderjit y Foy (1999) evaluaron el rol de los microorganismos del suelo sobre el efecto de

Artemisia vulgaris L. usando un suelo esterilizado y sin esterilizar. De ese modo observaron una reducción significativa en el crecimiento radical de *Trifolium pratense* L. en el suelo sin esterilizar comparado con el control, mientras que las raíces no presentaron ningún cambio en el suelo esterilizado. Sería importante determinar cómo influyen el clima y las propiedades del sustrato sobre el rol de los microorganismos del suelo en la alelopatía.

La alelopatía ha recibido mucha atención tal como lo demuestran las numerosas publicaciones en este área (Rice, 1984; Anaya 1999; Ridenour y Callaway, 2001; Inderjit y Nilsen, 2003; Inderjit 2005; Kaur *et al.*, 2009, entre otras). A pesar de los numerosos trabajos que evidencian el efecto inhibitorio de los residuos provenientes de hojas de altamisa en ensayos en macetas (Duke *et al.*, 1987; Lydon *et al.*, 1997) y a campo (Delabays *et al.*, 2008) y del aleloquímico artemisinina (Jessing *et al.*, 2009) como la sustancia pura agregada en macetas, los resultados provistos en este capítulo evidenciaron un efecto neutro o positivo de las distintas fuentes de altamisa con respecto al control, pero en ningún caso de inhibición. Las diferencias de estos estudios con los resultados en este capítulo podrían deberse a las concentraciones de fuentes de altamisa y a su forma de aplicación en el sustrato y las plantas receptoras testeadas. Por ejemplo, un concentración 0,37 a 1,10 % de hojas de altamisa (volumen de hojas volumen de suelo), inhibieron el crecimiento de plantas de soja de un 20 a un 50 % (Lydon *et al.*, 1997), mientras que Delabays *et al.*, (2008) reportaron la disminución en el crecimiento de un 22 a 52 % con respecto al control, cuando se incorporaron de 50 a 400 g de hojas de altamisa por m⁻² de suelo.

Es posible que las diferentes respuestas observadas en los dos tipos de sustratos evaluados estén asociadas a las diferencias en las propiedades físicas, químicas y biológicas entre estos sustratos. Sin embargo, serían necesarios más estudios a fin de detectar si dosis crecientes de estas fuentes de altamisa (constituidos por el aceite esencial y la artemisinina), afectarían los procesos de nodulación y fijación biológica del N y el crecimiento en el cultivo de soja. También es destacable que tanto la competencia intraespecífica (mayor número de plantas de soja en una misma maceta) o la competencia interespecífica por parte de altamisa, podrían generar otro tipo de respuestas a los resultados hallados en el presente capítulo. Sin embargo, como se discutió en los capítulos anteriores (2 y 3), la altamisa ejerció un efecto neutro o positivo sobre la soja.

Por definición, la interacción alelopática involucra al menos un aleloquímico (Vokou *et al.*, 2006). Este efecto sobre el cultivo, puede estar dado a través de las plantas vivas (*i.e.* artemisinina y aceite esencial, Capítulos 2 y 3) o a través de los órganos caídos (*e.g.* hojas) o un aleloquímico determinado (presente capítulo), interactuando con el medio edáfico y los microorganismos del suelo (Inderjit, 2005). Sin embargo, resulta interesante investigar, de que manera la acción conjunta o individual de los aleloquímicos de altamisa, producen un efecto sobre la fijación biológica del N, y más específicamente sobre la bacteria fijadora de N en soja, *B. japonicum*.

Los resultados presentados apoyan los interrogantes que serán abordados en el Capítulo 5: (i) ¿Existe un efecto directo de los aleloquímicos (artemisinina y aceite esencial) provenientes de altamisa sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum*, bacteria encargada de la fijación biológica del nitrógeno (FBN)?, y (ii) El efecto de los aleloquímicos, ¿será distinto si el terpeno es volátil (aceite esencial) o no volátil (artemisinina pura), o mas bien habrá un efecto de interacción entre ambos?

4.5 CONCLUSIONES

De acuerdo a lo planteado en el objetivo de este capítulo, se determinó el efecto de distintas fuentes de artemisinina (biomasa de altamisa verde, seca y artemisinina pura) sobre el crecimiento, nodulación y rendimiento en plantas de soja creciendo en dos tipos de sustratos: arcilloso y arenoso. Los resultados hallados permiten concluir:

(i) Los aleloquímicos provenientes de altamisa no evidenciaron ningún efecto negativo sobre la biomasa y el rendimiento de soja. Contrariamente a lo esperado, el tratamiento de artemisinina pura no tuvo un efecto negativo sobre la soja, según la dosis evaluada.

(ii) La respuesta de soja, medida a través de la biomasa y el peso específico de nódulos en V4, y el rendimiento, difirió según las fuentes de altamisa y el tipo de suelo.

CAPITULO 5

Efectos de los aleloquímicos de altamisa sobre el crecimiento
de *Bradyrhizobium japonicum*

5.1 INTRODUCCIÓN

Numerosos microorganismos del suelo, *i.e.* bacterias fijadoras de N, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, micorrizas arbusculares y endófitos, pueden afectar el crecimiento y rendimiento de las especies vegetales. La soja, como el resto de las leguminosas, tiene la capacidad de asociarse de forma simbiótica con un grupo de bacterias fijadoras de N llamadas rizobios del género *Bradyrhizobium*. Estos microorganismos, encargados de la fijación biológica del N, transfieren entre un 80 a 90 % del N fijado a la planta (Maddonni *et al.*, 2003). La importancia de la fijación biológica está dada no sólo por la cantidad de N que aporta al cultivo sino también porque dicho aporte se produce durante el período crítico para la determinación del rendimiento (R4-R6, Fehr y Caviness, 1977).

Los aleloquímicos liberados al ambiente por varias especies de malezas deprimen no solo el crecimiento de los cultivos sino también el de los microorganismos como *Rhizobium leguminosarum* y *R. japonicum*, afectando la fijación biológica del nitrógeno en diversas especies de leguminosas (Rice, 1979; Putman y Weston, 1986; Batish *et al.*, 2007). Muchos trabajos evidencian la fitotoxicidad de los aceites esenciales y los terpenos no volátiles del género *Artemisia* sobre las especies vegetales (Lydon *et al.*, 1997), los herbívoros (Kordali *et al.*, 2006) y los microorganismos (Setzer *et al.*, 2004; Laciari *et al.*, 2009) que los reciben. En este sentido, la actividad alelopática de *A. annua*, maleza que acompaña al cultivo de soja (de la Fuente *et al.*, 1999 y 2006, Faccini y Puricelli, 2007), es atribuida principalmente al metabolito secundario artemisinina, sesquiterpeno lactona no volátil (Delabays *et al.*, 2001) y a otros compuestos del aceite esencial (Lydon *et al.*, 1997) que se sintetizan principalmente en los tricomas glandulares de la biomasa aérea de altamisa (Ferreira *et al.*, 2005). Varios trabajos reportan el efecto de estos compuestos con diferentes mecanismos de acción (Stiles *et al.*, 1994; Romagni *et al.*, 2000; Abraham *et al.*, 2003, Burt, 2004). Por ejemplo, Stiles *et al.* (1994) destacan a la artemisinina como un compuesto inhibidor de la respiración en *Lemna minor* L. Mientras que entre los compuestos, constituyentes del aceite esencial de altamisa (Cuadro Anexo 5.1), se destacan por su actividad biológica: el 1,8 cineol, por inhibir la mitosis (Romagni *et al.*, 2000), el alfa-pineno, por desacoplar la fosforilación oxidativa e inhibir el transporte de electrones en la mitocondria (Abraham *et al.*, 2003) y la tuyaona y el alcanfor, por causar alteraciones en las membranas de las bacterias (Burt, 2004).

Por otro lado, la actividad de los aleloquímicos sobre la especie receptora no solo dependerá de las cantidades relativas de los mismos, sino también de las interacciones entre los compuestos (Einhelling, 1999), dado que pueden inhibir o potenciar sus modos de acción (Inderjit *et al.*, 2005). Por ejemplo, Kong *et al.* (1999) investigaron las interacciones entre aleloquímicos presentes en *Argeratum conyzoides* L. y encontraron un efecto sinérgico entre los terpenoides provenientes de esta especie.

A pesar de que los efectos negativos de los aleloquímicos sobre los microorganismos como *B. japonicum* sean los más documentados (Mallik y Tesfai, 1987), existen en la bibliografía evidencias sobre la estimulación en el crecimiento de esta bacteria dependiendo del tipo de aleloquímico involucrado. Por ejemplo, Mallik y Williams (2005) reportaron un efecto promotor sobre el crecimiento de bacterias de *B. japonicum* cuando se incorporaron al medio de cultivo, de 2 a 10 mg ml⁻¹ de aleloquímicos provientes de *Chenopodium album* y *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. Asimismo, puede haber respuestas no lineales de las dosis sobre el crecimiento bacteriano. Tal es el caso de los aleloquímicos provenientes de *Ambrosia psilostachya*

DC., que estimula el crecimiento de *B. japonicum* con concentraciones entre 2 a 4 mg ml⁻¹ mientras que a niveles mayores a 4 mg ml⁻¹ lo inhiben (Mallik y Tesfai, 1987).

En este contexto, debido a la importancia para el cultivo de soja del aporte de N fijado y a la sensibilidad de estas bacterias fijadoras a los aleloquímicos (Rice, 1979; Batish *et al.*, 2007), por un lado, y a la presencia de los aleloquímicos en altamisa (artemisinina y aceite esencial) que llegan al suelo (Delabays *et al.*, 2008; Jessing *et al.*, 2009), por el otro, es necesario estudiar la relación *B. japonicum*-altamisa, dado que en la actualidad no existe bibliografía que documente la interacción de ambos componentes. Conocer los efectos de los aleloquímicos provenientes de altamisa sobre el crecimiento de la bacteria, contribuiría en gran medida a dilucidar la existencia de fitotoxicidad por parte de diferentes fuentes y concentraciones de aleloquímicos provenientes de altamisa sobre la bacteria responsable de la fijación biológica de nitrógeno (FBN).

Por lo expuesto, los objetivos de este capítulo son evaluar el efecto directo de los aleloquímicos provenientes de *A. annua* (i) artemisinina, compuesto no volátil, (ii) aceite esencial, de menor peso molecular y (iii) la mezcla de ambos compuestos, sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum*, bacteria utilizada en la formulación de los inoculantes comerciales para semillas de soja.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de evaluar y medir el crecimiento de la bacteria fijadora de N, *Bradyrhizobium japonicum* ante el agregado de aleloquímicos volátiles y no volátiles, se realizaron dos experimentos en condiciones controladas en los laboratorios de las Cátedras de Microbiología (experimento cualitativo) y de Bioquímica (experimento cuantitativo) de la FAUBA. Además, con la finalidad de testear la variabilidad de la respuesta de *B. japonicum* ante los tratamientos de los aleloquímicos, se utilizaron dos cepas de *B. japonicum* provenientes de diferentes inoculantes comerciales. En el experimento cualitativo se utilizó *Bradyrhizobium japonicum* E109, una cepa muy utilizada en la formulación de los inoculantes en la Argentina (Soria *et al.*, 2006), mientras que en el experimento cuantitativo se utilizó la cepa SEMIA 5079, procedente de otro inoculante comercial.

5.2.1 Experimento Cualitativo

Cultivo de *B. japonicum*

A partir de un inoculante comercial se aislaron y cultivaron en medio líquido células de *B. japonicum*. Estos aislamientos se inocularon (dilución 1:100) en matraces de mayor volumen provistos de tapón de algodón. Las bacterias se cultivaron aeróbicamente en medio manitol-extracto levadura (YMB, Vincent, 1970) (Cuadro 5.1) con agitación orbital (120 rpm) a 30°C durante 120 h.

Cuadro 5.1 Composición del medio Manitol-extracto levadura (Vincent, 1970).

Compuestos	Cantidad
Manitol	10 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,66 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2 g
NaCl 0,1 g	0,1 g
Extracto de levadura	0,5 g
FeCl ₃ .6 H ₂ O (10 %)	50 ml
MnSO ₄ (10%)	50 ml
H ₂ O destilada c.s.p.	1 L
Ajustar el pH \approx 6,8 con NaOH 10 N	

El medio de cultivo se preparó con los mismos componentes y cantidades del medio Manitol-extracto levadura con el agregado de 5 ml de Rojo congo (0,25 %) y 15 g de Agar (YMA, Vincent 1970). Cuando se obtuvo el volumen final se corrigió el pH (6,8) con NaOH 10 N. El medio de cultivo se trasvasó recipientes de vidrio (15 ml) con tapa y se esterilizaron en autoclave. Los mismos se mantuvieron a temperatura ambiente (20 °C) hasta su utilización.

Diseño del experimento

El experimento fue DCA en arreglo factorial con 3 repeticiones. Los factores fueron: artemisinina, con tres niveles (*A1*, *A2* y *A3*), aceite esencial, con dos niveles (*E1* y *E2*), el efecto de interacción de ambos con un nivel (*A2* x *E1*) y el control (C). Los niveles de los tratamientos de los aleloquímicos (Cuadro 5.2) surgieron de las concentraciones reportadas en la bibliografía (Chen y Leather 1990, Kordali *et al*, 2006). Asimismo, los niveles bajos de artemisinina (*A1* y *A2*), se determinaron en base a los menores niveles de artemisinina adsorbidos en el carbón activado de las parcelas experimentales a campo, mientras que el nivel alto (*A3*) surgió del promedio de los mayores niveles de este compuesto retenido en el adsorbente proveniente de las parcelas experimentales de mayor densidad (Capítulo 3). Tanto los niveles de artemisinina como los del aceite esencial no fueron los mismos que los cuantificados en el campo experimental, dado que a campo, la tasa de liberación de estos compuestos son menores en relación a los bioensayos, donde la disponibilidad del aleloquímico es el 100 % (Kaur *et al.*, 2009).

El nivel *A2* x *E1* se determinó considerando la acción combinada de los aleloquímicos provenientes de las hojas e inflorescencias de altamisa, como ocurre en los sistemas naturales. Dentro de esta interacción se testeó el nivel medio de artemisinina (*A2*) y el nivel bajo de aceite esencial (*E1*) por considerarse niveles mas representativos de estos sistemas.

Cuadro 5.2. Tratamientos de artemisinina y aceite esencial evaluados.

Factor	Nivel	Concentración de aleloquímicos por ml de medio de cultivo YMA
Artemisinina pura ^a	<i>A1</i>	2 $\mu\text{l ml}^{-1}$
	<i>A2</i>	4 $\mu\text{l ml}^{-1}$
	<i>A3</i>	80 $\mu\text{l ml}^{-1}$
Aceite esencial ^b	<i>E1</i>	1,6 $\mu\text{l ml}^{-1}$
	<i>E2</i>	3,46 $\mu\text{l ml}^{-1}$
Interacción	<i>A2 x E1</i>	4 $\mu\text{l}^{\text{a}} \text{ ml}^{-1}$ + 1,6 $\mu\text{l}^{\text{b}} \text{ ml}^{-1}$
Control	<i>C</i>	0 $\mu\text{l ml}^{-1}$

^aSolución patrón de artemisinina: 1 mg de artemisinina/100 ml de etanol (pH=5). ^b Aceite esencial: 0,49 ml de aceite esencial/100 g de biomasa seca.

Con el fin de agregar las soluciones de los diferentes tratamientos (Cuadro 5.2), cada medio de cultivo se mantuvo líquido mediante un baño termostatzado (55 °C) y luego se mezcló por agitación.

La solución patrón de artemisinina se preparó utilizando 1 mg de artemisinina ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$, Mr: 282,33 g mol^{-1} , Sigma-Aldrich, 98 %) en 100 ml de etanol. De la solución patrón se tomó una alícuota según el tratamiento, y se disolvió en el medio líquido YMA, dando como resultado los tratamientos *A1*, *A2* y *A3* (Cuadro 5.2).

El aceite esencial de altamisa se extrajo de la biomasa de hojas e inflorescencias de *A. annua* del tratamiento de monocultura de altamisa (*D5*) del experimento 2 (Año 2007). El proceso de extracción y determinación de la composición del aceite esencial (Anexo 5.1), se realizó según la metodología descrita en el capítulo 3. En los tratamientos *E1* y *E2* se tomó la concentración especificada (Cuadro 5.1) y se disolvió en el medio de cultivo líquido YMA.

El nivel del factor de interacción *A2 x E1* se preparó adicionando al medio de cultivo el componente de artemisinina 4 $\mu\text{l ml}^{-1}$ más el componente de aceite esencial 1,6 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Asimismo el tratamiento control se preparó disolviendo 10 μl de etanol en 15 ml del medio de cultivo YMA (Cuadro 5.2).

Aplicación de los tratamientos

A la siembra del inóculo, se colocaron 3 ml de medio de cultivo conteniendo su respectivo tratamiento, en placas de Petri (5 ml). Una vez solidificado el medio, se sembraron las bacterias (100 μl) en las cajas de Petri y se cultivaron en estufa a 30 °C por 120 h. La preparación de los reactivos y los medios de cultivo así como la aplicación de los tratamientos, se realizaron bajo flujo laminar para evitar la contaminación de los mismos.

5.2.2 Experimento Cuantitativo

El cultivo de *B. japonicum*, el medio y los tratamientos testeados se llevaron a cabo como se indica en el apartado anterior 5.2.1., excepto por la dilución del cultivo de células de *B. japonicum* y los niveles del factor aceite esencial evaluados.

En cuanto al cultivo de *B. japonicum* en medio líquido, se llevó a cabo una dilución seriada desde 1:10 hasta 1:100.000 con el objetivo de detectar la dilución en la que mejor se observaron las colonias para ser cuantificadas. El experimento se realizó por triplicado.

En este ensayo, dado que no se contaba con suficiente cantidad de aceite esencial para realizar los dos niveles de *E*, sólo se pudieron realizar el nivel *E1* y la interacción *A1* x *E1*. Luego de la aplicación de los 6 tratamientos de aleloquímicos, las bacterias se cultivaron en estufa a 30 °C por 120 h.

5.2.3 Determinaciones

Cinco días posteriores a la aplicación de los tratamientos y a la siembra de *B. japonicum*, en el experimento cualitativo, se determinó visualmente el crecimiento (“en césped”) de las bacterias. Paralelamente se tomaron imágenes fotográficas de cada tratamiento con cámara digital. Mientras que en el experimento cuantitativo, luego de 5 días desde la siembra de la bacteria, se cuantificó el número de colonias formadoras (UFC) en la dilución de bacterias 1:10000. Asimismo, se midió el pH de la solución de artemisinina de manera de constatar que el efecto sobre el crecimiento bacteriano fue producto de los aleloquímicos, y no debido a variaciones en el pH de las soluciones testeadas (Wardle *et al.*, 1992). A los 9 días posteriores a la aplicación de los tratamientos (216 h), se registró el crecimiento de las UFC a través de imágenes fotográficas tomadas en el centro de cada caja de Petri, con lupa Leica (MZ6), con aumento 6,3x, a una misma distancia focal. Con fines ilustrativos, se muestra sólo una fracción circular de parte central de cada unidad experimental.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Experimento Cualitativo

En este experimento se observó que las concentraciones *A1* y *A2* produjeron una reducción similar del crecimiento respecto al control, a pesar de que la concentración de artemisinina en *A2* (4 µl ml⁻¹), fuese el doble que en *A1* (2 µl ml⁻¹). Mientras que la dosis más elevada de artemisinnina (*A3*) impidió totalmente el crecimiento bacteriano (Fig. 5.1).

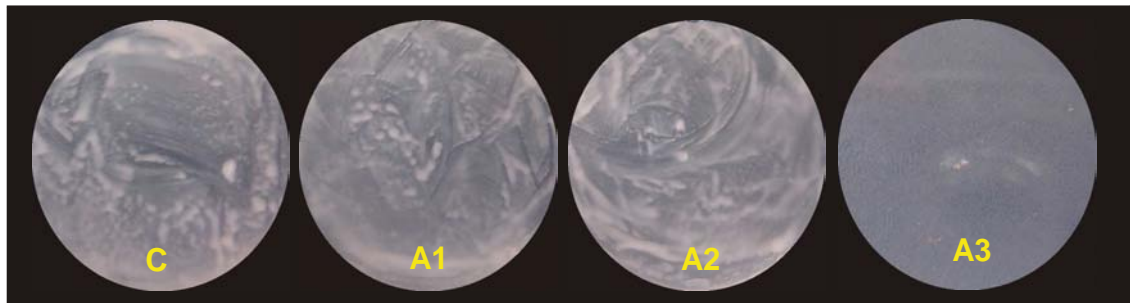


Figura 5.1 Fotografía explicativa del experimento cualitativo. Observación del crecimiento de *B. japonicum* a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos control (C) y de artemisinina A1, A2 y A3 (2, 4 y 80 $\mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente). A los fines ilustrativos se muestra una sola repetición de las tres evaluadas. Las fotografías se tomaron en el centro de cada placa a la misma distancia focal en todos los tratamientos. En la Figura Anexo 5.1 se muestra la foto de todas las repeticiones.

Con respecto a los tratamientos de aceite esencial, se pudo observar que el aumento del nivel de aceite esencial de E1 a E2, trajo aparejado una disminución en el crecimiento de las bacterias (Fig. 5.2). Por otro lado, parece haber un efecto aditivo negativo sobre el crecimiento de *B. japonicum* al incorporarse conjuntamente la artemisinina y la baja dosis de aceite esencial. (A2xE1, Foto 5.2).

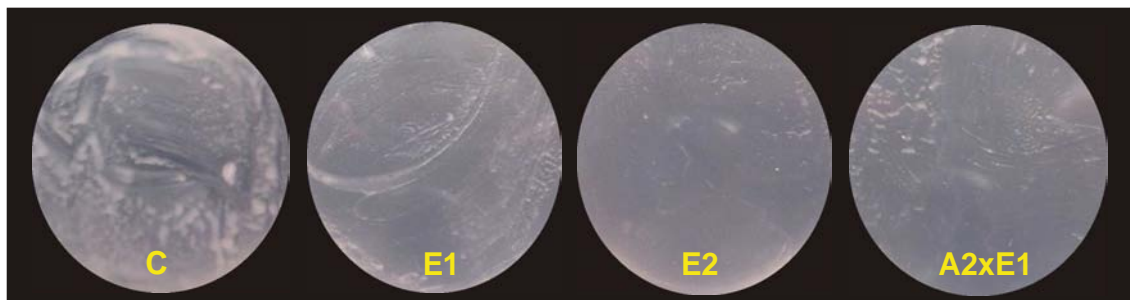


Figura 5.2 Fotografía explicativa del experimento cualitativo. Observación del crecimiento de *B. japonicum* a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos control (C), de aceite esencial E1 y E2 (1,6 y 3,46 $\mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente), y la interacción de artemisinina y aceite esencial A2xE1 (4 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de artemisinina x 1,6 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de aceite esencial). A los fines ilustrativos se muestra una sola repetición de las tres evaluadas. En la Figura Anexo 5.2 se muestra la foto de todas las repeticiones.

5.3.2 Experimento Cuantitativo

En el recuento de bacterias, se observó una disminución de las UFC para los tratamientos A1 y A2 pero ambos valores se asemejaron al control. Sin embargo, la concentración de 80 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (A3) inhibió el crecimiento. En el A2, los valores de UFC fueron más cercanos al control a pesar de que la dosis de artemisinina en el medio fue el doble con respecto a A1. Con respecto al tratamiento de aceite esencial E1, hubo una disminución en la cantidad de UFC. En relación al tratamiento de interacción artemisinina por aceite esencial (A2 x E1), se cuantificó un nivel muy inferior de UFC con respecto al resto de los tratamientos y comparadas con el control pero superior a A3 (Fig. 5.3). El error estándar de la media de los tratamientos C, A1, A2 y E1 fue nulo dado que las UFC no variaron en las tres repeticiones evaluadas.

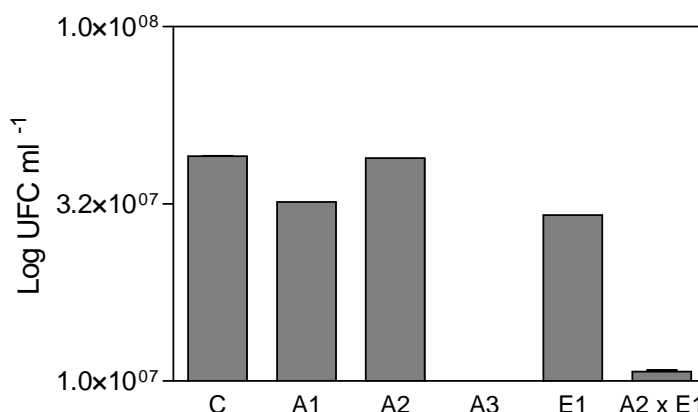


Figura 5.3 Unidades formadoras de colonia (UFC ml⁻¹) de *Bradhyrizzobium japonicum* a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos de control (C), dosis crecientes de artemisinina (A1, A2 y A3, 2, 4 y 80 µl ml⁻¹, respectivamente), aceite esencial de altamisa (E1, 1,6 µl ml⁻¹) y su interacción (A2 x E1, 4 µl ml⁻¹ de artemisinina x 1,6 µl ml⁻¹ de aceite esencial). El error estándar de la media de los tratamientos C, A1, A2 y E1 fue nulo dado que las UFC no variaron en las tres repeticiones.

En el control (C, foto central de la Fig 5.4) se pudo observar no solo un mayor número de colonias, sino además un mayor tamaño (Fig 5.3, Foto 5.4) de las mismas. Con respecto a los tratamientos de artemisinina, en A1 se visualizó una menor cantidad de colonias y de menor tamaño. Sin embargo, tal como se cuantificó en el recuento, en el tratamiento A2 se asemejó al control, observándose colonias casi del mismo tamaño para ambos tratamientos. Si bien en el recuento de UFC el crecimiento de *B. japonicum* en el tratamiento A3 fue nulo, en las imágenes tomadas con lupa se evidenció el crecimiento de las bacterias, debido a que las fotos fueron registradas cuatro días posteriores al recuento (Fig. 5.4). Al parecer, en el tratamiento A3, la dosis de 80 µl ml⁻¹ de artemisinina generaría una disminución en el crecimiento bacteriano, siendo nulo su crecimiento a las 120 h desde la inoculación. Este mismo patrón se observó en el experimento cualitativo. Con respecto a E1 se hizo notable la baja densidad de la colonia, mientras que llamativamente en la interacción A2 x E1, si bien es menor la cantidad de colonias, no fue más bajo que E1, como evidencian las UFC en el recuento.

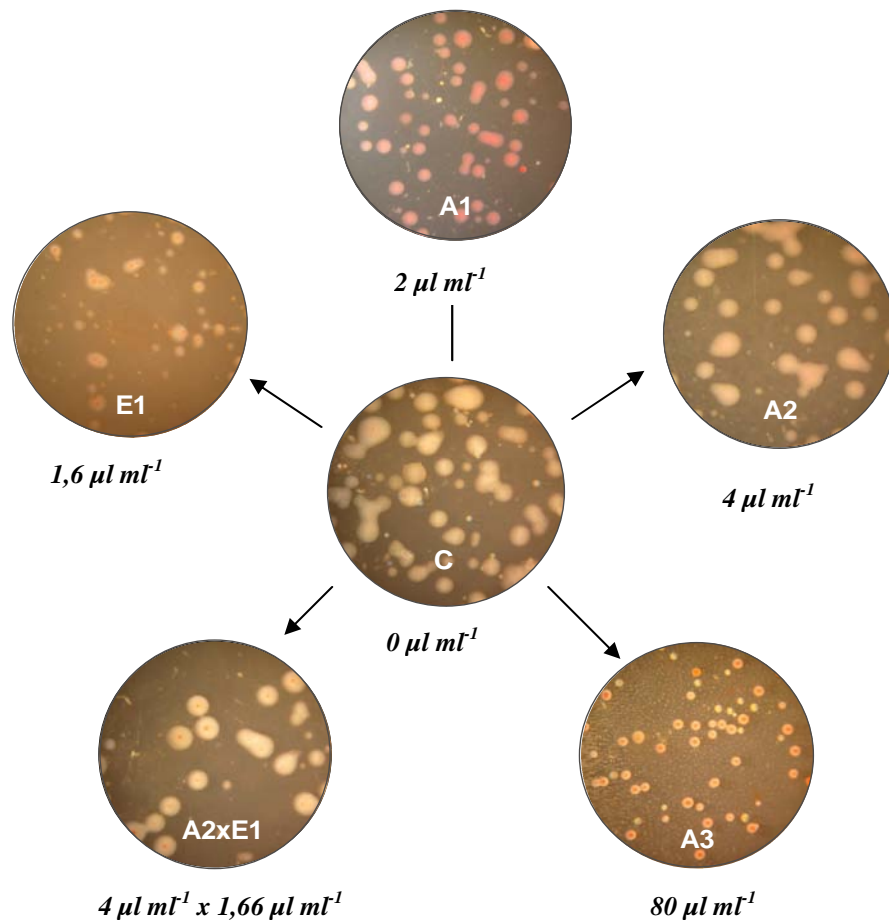


Figura 5.4 Esquema de imágenes de colonias de *Bradhyrizzobium japonicum* de los tratamientos de artemisinina (A1, $2 \mu\text{l ml}^{-1}$; A2, $4 \mu\text{l ml}^{-1}$ y A3, $80 \mu\text{l ml}^{-1}$), aceite esencial (E1, $1,6 \mu\text{l ml}^{-1}$) y su interacción ($4 \mu\text{l ml}^{-1} \times 1,66 \mu\text{l ml}^{-1}$) y Control (C). Las imágenes se tomaron a las 216 h posteriores a la siembra y aplicación de los tratamientos, con Lupa Leica (MZ6) a una misma distancia focal, con aumento 6,3x. La falta de nitidez de algunas fotos, puede deberse a que las mismas se fotografiaron a través de la tapa de la caja de Petri.

5.4 DISCUSION

En este capítulo se evaluó el efecto directo de los aleloquímicos provenientes de *A. annua*, (i) la artemisinina, (ii) el aceite esencial de menor peso molecular y (iii) la interacción de ambos compuestos, sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum*, bacteria utilizada en la formulación de los inoculantes comerciales para semillas de soja.

En relación a la artemisinina el crecimiento de la bacteria fue claramente afectado solo a altas concentraciones de este compuesto. No es sorprendente que un incremento de la dosis de artemisinina como en A3 ($80 \mu\text{l ml}^{-1}$) afecte notablemente el crecimiento de *B. japonicum* (Exp. cualitativo), siendo nula la cantidad de UFC (Exp. cuantitativo). Este efecto negativo coincide con las investigaciones de Dawson y Seymour (1983), quienes reportaron un efecto negativo sobre el crecimiento de *Rhizobium japonicum* cuando las bacterias crecieron en un medio de cultivo enriquecido con juglona, un aleloquímico proveniente de *Juglans nigra*. La comparación de este compuesto con el de la artemisinina en estos experimentos, se debe a que ambos tienen similar mecanismo de acción, el de afectar la respiración (Seigler, 2006) a través de la estimulación del consumo de oxígeno (Dayan *et al.*, 1999). Por otro lado, el mecanismo responsable de la inhibición en el crecimiento a altas dosis de artemisinina podría involucrar una reducción en la mitosis (Dayan *et al.*, 1999; Duke y Dayan, 2006), otro mecanismo de acción que se atribuye a la artemisinina (Seigler, 2006). No obstante, a las 216 h de la siembra del inóculo se observó un crecimiento retrasado de la bacteria. Estos resultados están relacionados con los trabajos de Karr *et al.* (1992), quienes evidenciaron un retraso en la nodulación de dos semanas y por ende en el crecimiento de *B. japonicum* cuando se aplicó un aleloquímico (*i.e* fitoalexina: gliceolina) en el medio de cultivo. Este efecto retardado en el crecimiento podría deberse a que las bacterias que logran sobrevivir, inician su crecimiento tardíamente (Vaughn, 1995). Por otro lado, resulta curioso, que con la dosis A2 ($4 \mu\text{l ml}^{-1}$), el crecimiento de la bacteria no se afectase como a dosis menores en A1 ($2 \mu\text{l ml}^{-1}$), sin embargo el orden de magnitud de la reducción en las UFC entre A1 y A2 con respecto al control, no fueron muy marcados. Dado que se realizó una sola evaluación cuantitativa y el análisis deriva en las seudoréplicas, la interpretación en estos resultados debería ser cuidadosa. A pesar de que el fenómeno alelopático comprende interacciones de estimulación (positivas) como de inhibición (negativas) (Rice, 1984), en la bibliografía son raros los ejemplos que evidencian los efectos de estimulación concernientes a la alelopatía (Delabays *et al.*, 2008). Aparentemente los estudios sobre la promoción del crecimiento en los microorganismos debido al efecto de los aleloquímicos recibió poca atención y en consecuencia son escasos los estudios documentados en la bibliografía (Mallik y Tesfai, 1987). Un ejemplo de estos efectos positivos se encontró en investigaciones realizadas por Mallik y Tesfai (1990) donde se evidenció una estimulación en el crecimiento de *B. japonicum* cuando se incorporaron al medio de cultivo aleloquímicos provenientes de *Chenopodium album* y *Setaria viridis*, inclusive a altas dosis de terpenos (8 mg ml^{-1}).

Resulta importante resaltar que no se puede considerar una respuesta umbral de *B. japonicum* ante el agregado de artemisinina, entre los tratamientos A2 y A3, dado que no existen concentraciones intermedias de este compuesto entre ambos tratamientos. Es por ello que se requerirían más experimentos de este tipo, para detectar la concentración exacta en la cual el crecimiento del simbiote resulta afectado.

En cuanto a los tratamientos de aceite esencial se observó un menor crecimiento aparente de la bacteria en E1 y E2 (experimento cualitativo) y una disminución de las UFC en E1. Estos resultados coinciden con los descriptos por otros autores, quienes observaron un efecto inhibitor de los aceites esenciales provenientes del género

Artemisia sobre el crecimiento de otras bacterias (Nagy y Tengerdy, 1967; Verdian-rizi *et al.*, 2008; Laciari *et al.*, 2009, Mahboubi y Farzin, 2009). Las UFC de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Neisseria sicca*, disminuyeron notablemente (de 10^8 a 10^2) cuando crecieron en el medio de cultivo con concentraciones de 0 a $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ de aceite esencial proveniente de *Artemisia nova* A. Nels. (Nagy y Tengerdy, 1967). Por otro lado, el trabajo de Verdian-rizi (2009) demostró un efecto inhibitorio sobre otras bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* cuando fueron incorporados al medio de cultivo $3,2$ y $6,4 \mu\text{l ml}^{-1}$ de aceite esencial proveniente de *A. annua* cuyos dos componentes principales (*i.e.* alcanfor y 1,8 cineol) fueron análogos a los obtenidos en estos experimentos. En efecto, la inhibición del aceite esencial podría estar dado por la desestructuración de los fosfolípidos de las membranas de las células eucariotas (Smith *et al.*, 2007).

Los trabajos de Lydon *et al.* (1997), evidencian que la actividad fitotóxica de altamisa no solo puede ser explicada por la artemisinina pura, sino además por los terpenos provenientes de sus hojas, dado que la inhibición en la germinación de *Amaranthus retroflexus* fue mayor cuando en el medio edáfico estuvieron presentes ambos tipos de compuestos. En coincidencia con estos resultados, en el tratamiento A2xE1 se observó un efecto aditivo y negativo de la artemisinina y el aceite esencial sobre el crecimiento de *B. japonicum*. Sin embargo, comparando estos resultados con los hallados en este Capítulo 4, en relación al efecto de incorporación de biomasa verde altamisa (hojas e inflorescencias) sobre la nodulación fueron los opuestos: neutro o positivos. La divergencia de estos resultados pone de manifiesto que los experimentos en condiciones de laboratorio demuestran el potencial alelopático de algunas interacciones (Inderjit y Weston, 2000), en este caso *Bradyrhizobium*-altamisa. Sin embargo hay que tener especial cuidado a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio a otras escalas, como las de planta o de cultivo (Wardle *et al.*, 1998), dado que el suelo afecta la disponibilidad de los aleloquímicos y por lo tanto modifica el tipo de respuesta de los organismos receptores (*i.e.* plantas, animales, microorganismos) (Inderjit *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2009). En este sentido, son necesarios más experimentos que analicen la relación *Bradyrhizobium*-aleloquímicos considerando el sustrato utilizado para su estudio.

Existen varias investigaciones que estudian el efecto de los sesquiterpenos lactona, especialmente la artemisinina, y los componentes del aceite esencial de altamisa, por su alto valor medicinal y aromático (Kordali *et al.*, 2006) y por su rol frente a los organismos receptores, *i.e.* plantas (Chen y Leather, 1990; Lydon *et al.*, 1997), herbívoros (Lenardis *et al.*, 2011) y microorganismos (Cavar *et al.*, 2012). No obstante, deberían realizarse más investigaciones en condiciones controladas (laboratorio) y semi-controladas (en macetas o en parcelas a campo), para determinar no sólo la respuesta umbral del crecimiento de *B. japonicum* ante la presencia de los aleloquímicos de altamisa, sino también cuantificar la fijación biológica del N a través de la reducción de acetileno a etileno (Schwinghamer *et al.*, 1970), técnica que permite cuantificar la capacidad de fijación del N a través de la actividad del complejo enzimático nitrogenasa (Dilworth, 1966).

5.5 CONCLUSIONES

De acuerdo a lo planteado en el objetivo de este capítulo, se evaluó el efecto directo de los aleloquímicos provenientes de *A. annua* (artemisinina y aceite esencial) y la mezcla de ambos compuestos sobre el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum*. Los resultados obtenidos permiten concluir: (i) no todas las dosis de artemisinina exploradas actuaron negativamente sobre el crecimiento de *B. japonicum*, pero si una dosis elevada inhibió el crecimiento de las bacterias, (ii) las dosis crecientes de aceite esencial redujeron el crecimiento de la bacteria fijadora de N, y (iii) el efecto inhibidor sobre el crecimiento de *B. japonicum* fue mayor, cuando se aplicaron ambos tipos de aleloquímicos al medio de cultivo.

CAPITULO 6

Discusión y conclusiones generales

6.1 SINTESIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y CONTRASTE DE HIPOTESIS

Una de las interferencias mas estudiadas entre el cultivo y la maleza ha sido la competencia, evidenciada a través de las numerosas publicaciones en esta área. Sin embargo, la alelopatía en el sistema cultivo-maleza ha tomado relevancia en los últimos años. No obstante solo una pequeña fracción de la bibliografía vinculada a la alelopatía hace referencia a estudios realizados en condiciones naturales de campo y en sistemas de simple complejidad (*i.e.* en un mismo nivel trófico). Asimismo, la alelopatía, que en sus orígenes era considerada una interferencia negativa, se reconoce actualmente en un sentido más amplio como una interferencia positiva, negativa o neutra. Sin embargo, aún son escasos los trabajos que evidencian algún efecto positivo o neutro de esta interacción (Anaya, 2006). La competencia y la alelopatía actúan simultáneamente, pero su importancia relativa varía dependiendo de las especies involucradas, del contexto ecológico (Callaway, 1995) y del nivel de aproximación utilizado para estudiarlas (Inderjit y Weston, 2000).

Hasta el presente no existían estudios de la maleza alelopática *Artemisia annua* a campo, explorando el efecto sobre la respuesta del cultivo de soja (nodulación, crecimiento y rendimiento) ante variaciones en la densidad de altamisa (Capítulos 2 y 3) o diferentes fuentes de altamisa (Capítulo 4) y a la aplicación de herbicida (glifosato) en dosis subletales (Capítulos 2 y 3). Tampoco se había estudiado el efecto de los aleloquímicos de altamisa sobre el crecimiento de *B. japonicum*, bacteria fijadora del N en las plantas de soja en condiciones de laboratorio (Capítulo 5).

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan elementos para construir un modelo conceptual que integre algunos de los principales componentes del agroecosistema (soja, altamisa y microorganismos del suelo, más específicamente *B. japonicum*) y algunas de sus principales interacciones (competencia, alelopatía y mutualismo), afectados por el manejo (densidad, herbicidas) y cuantificados a través de las principales variables respuesta (rendimiento, biomasa, aleloquímicos) (Fig. 6.1).

El objetivo principal de esta tesis fue analizar las interferencias competitivas y alelopáticas entre un cultivo de soja y una maleza productora de metabolitos secundarios, *Artemisia annua* y su impacto sobre el rendimiento y la nodulación de cultivo ante cambios en la densidad de plantas y la dosis de herbicida.

En esta tesis se puso en evidencia que las interacciones generadas entre el sistema soja-maleza y, particularmente, la alelopatía de altamisa hacia la soja, dependen en gran medida del ambiente así como también de la escala en el que son analizadas. Así, las propiedades emergentes a una escala determinan que las respuestas observadas para un determinado nivel de organización (*e.g.* célula) no se manifiesten necesariamente en el nivel superior (*e.g.* población) (Jackson, 1984).

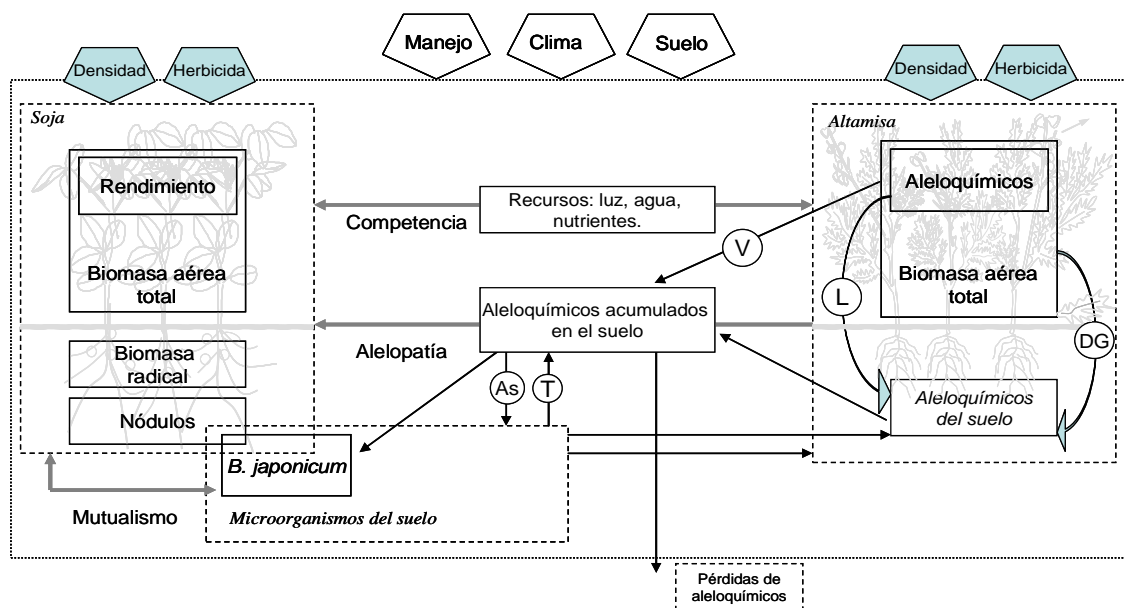


Figura 6.1 Modelo conceptual de las principales componentes del agroecosistema (soja, altamisa y microorganismos del suelo) y algunas de sus principales interacciones (competencia, alelopatía y mutualismo) cuantificadas a través de las principales variables respuesta (biomasa, rendimiento, aleloquímicos). V: Volatilización, L: Lixiviación, DG: Degradabilidad; As: Afinidad por el suelo, T: Transformación por los microorganismos del suelo.

En los experimentos a campo (Capítulo 2), de acuerdo al modelo de competencia cultivo-maleza propuesto por Cousens (1985 y 1991), el rendimiento de soja en respuesta al incremento de la biomasa de altamisa (densidad de plantas) se ajustó a un modelo hiperbólico cuando se redujo la alelopatía (parcelas C+). Estos resultados coinciden con otros autores (Oreja y González Andújar *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2009) quienes demostraron que los modelos hiperbólicos son los que mejor describen la relación de pérdida del rendimiento y densidad de la maleza en experimentos aditivos. Sin embargo y contrario al modelo exponencial propuesto por Lydon *et al.* (1997), cuando la alelopatía y la competencia actuaron simultáneamente (parcelas C-), el aumento en la densidad de la maleza no produjo una reducción densidad-dependiente en el rendimiento de soja (curva *i*, en las predicciones de la hipótesis 1.i, capítulo 1), a pesar de que las plantas de altamisa a altas densidades (D4) fueron lo suficientemente grandes para generar competencia y acumular aleloquímicos (artemisinina) en el suelo. Por otra parte, cuando el cultivo de soja estuvo acompañado de altamisa en su máxima densidad y sin carbón, se observó un efecto positivo sobre el número de raíces de soja en 2007. Esto coincide con las recientes investigaciones de Delabays *et al.*, (2008) quienes documentan, por primera vez, un efecto positivo de los aleloquímicos provenientes de altamisa sobre el crecimiento radical de *Solanum tuberosum*. Los resultados mencionados anteriormente, podrían explicarse a partir de un efecto positivo sobre la fijación biológica del nitrógeno (FBN), que si bien no se midió directamente, se observó como evidencia indirecta que la relación entre la biomasa de nódulos y número de nódulos fue mayor en presencia de los aleloquímicos. El efecto positivo o neutro de altamisa sobre la nodulación, crecimiento y rendimiento en soja se contraponen con los antecedentes documentados por otros autores, en altamisa-soja (Lydon *et al.*, 1997) y en altamisa-*Zea mays* (Delabays *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos permiten rechazar la **hipótesis 1 (i)** que plantea que ***“El aumento en la densidad de plantas de altamisa, al favorecer la acumulación de aleloquímicos en el medio edáfico, afectan negativamente la nodulación, el crecimiento o el rendimiento del cultivo de soja”***, dado que no se encontró un efecto negativo sobre el cultivo de soja frente a la presencia de los aleloquímicos de altamisa en el suelo.

En presencia de una dosis subletal de herbicida y contrariamente a lo esperado (curva *ii*, en las predicciones de la hipótesis 1.*ii*, capítulo 1), el rendimiento de soja permaneció estable a medida que se incrementó la biomasa de altamisa. Solo a altas densidades (D4) el rendimiento en soja tendió a decrecer un 15 % en presencia de los aleloquímicos. De acuerdo a Weidenhamer y Callaway (2010), las dosis subletales afectan la producción de aleloquímicos y en consecuencia la asociación entre las plantas-microorganismos, particularmente la FBN también resulta afectada. Esto sugiere que el efecto positivo de los aleloquímicos de altamisa a altas densidades (D4) sobre el cultivo de soja podría ser reducido por el efecto del herbicida. Trabajos sobre el efecto negativo del glifosato en el proceso de FBN, a través de la reducción de la actividad de la nitrogenasa, apoyan esta idea (Zablotowicz y Reddy, 2004). Por otro lado, los experimentos a campo demostraron que la nodulación resultó favorecida en presencia de los aleloquímicos independientemente de la aplicación del herbicida. Esto sugiere que la estabilidad en el rendimiento de soja a pesar del incremento de altamisa de 2 a 4 plantas, estaría explicado, en parte, por el efecto positivo en la nodulación. Este resultado se sustenta con las investigaciones de Batlang y Shushu (2007) quienes no encontraron un efecto negativo sobre la nodulación de *Vigna subterranea* cuando tuvo lugar la lixiviación de aleloquímicos provenientes de *Helianthus annuus*, a pesar de considerarse como en altamisa, una especie con un importante potencial alelopático. Los resultados obtenidos permiten rechazar la **hipótesis 1 (ii)** planteada: ***“La interacción de los factores de densidad y herbicida en dosis subletales, al aumentar más marcadamente la acumulación de aleloquímicos en el suelo, reducen aún mas la nodulación, el crecimiento o el rendimiento que los factores individuales”***, debido a que la interacción de los factores densidad y herbicida no produjo un efecto negativo mayor que sus factores individuales, sobre la nodulación y el crecimiento de soja.

La mayor producción de aleloquímicos en hojas e inflorescencias (H e I) regulada por el incremento en la densidad, generó una mayor acumulación de artemisinina en el suelo, encontrándose una relación lineal positiva en ambas variables. Estos resultados coinciden con los reportados por Jessing *et al.*, (2009) quienes registraron un aumento en el nivel de artemisinina en el suelo con el incremento de la biomasa de altamisa. En base a estos resultados se acepta la **hipótesis 2 (i)** que postula: ***“La densidad de plantas de altamisa, al aumentar la producción de H e I por superficie, incrementa la acumulación de artemisinina en el medio edáfico”***.

Según lo postulado por Herms y Mattson (1992), ante la restricción de recursos, la tasa de crecimiento resulta más afectada que la tasa de fotosíntesis, en consecuencia el excedente de fotoasimilados promueve el incremento en el contenido o concentración (Marchese y Figueira, 2005) de metabolitos secundarios (*i.e.* aceite esencial). De acuerdo al modelo propuesto por Koricheva (1999), a densidades intermedias (D3), la respuesta sobre la concentración relativa varió según el año. Esto podría estar relacionado a que el umbral de respuesta al estrés puede diferir según el proceso de crecimiento o metabolismo secundario involucrado (Herms y Mattson, 1992). Sin embargo, la concentración relativa de aceite esencial se incrementó en altas densidades (D4) y en ausencia de herbicida para ambos años. Dado que la variación en la

concentración podría estar dada por cambios en el contenido o en la biomasa de las plantas o en ambos (Koricheva, 1999), los resultados obtenidos podrían ser explicados a través de un incremento en la síntesis de los aleloquímicos y no por un aumento en la biomasa de las plantas (Veteli *et al.*, 2007). De esta manera, el análisis vectorial gráfico permitió analizar los cambios relativos del contenido y concentración de los aleloquímicos y el crecimiento relativo de las plantas según la disponibilidad de los recursos explorada. Por lo tanto, se acepta la **hipótesis 2 (ii)** postulada: ***“La densidad de plantas incrementa la concentración (%) del aceite esencial en H e I”.***

Como respuesta de las plantas a situaciones de estrés por el herbicida se esperaba menor producción y mayor concentración de aceite esencial y artemisinina en la biomasa de H e I de altamisa (Weidenhamer. y Callaway, 2010). Sin embargo, estas respuestas difirieron según el año y los aleloquímicos involucrados, con lo cual no se acepta la **hipótesis 2 (iii)** postulada: ***“La aplicación de herbicida en dosis subletales, al afectar el crecimiento de altamisa: reduce la producción de aleloquímicos (aceite esencial y artemisinina) por superficie pero aumenta su concentración en la biomasa de H e I, y reduce la acumulación de artemisinina en el medio edáfico”.*** En relación a la existencia de interacción entre la densidad y el herbicida sobre la producción y concentración de los aleloquímicos, sólo se observó esta interacción en el Exp. 1 (2006), sin cambios para el Exp. 2 (2007). Estos resultados permiten rechazar la **hipótesis 2 (iv)** propuesta: ***“La alta densidad de altamisa y el herbicida en dosis subletales, incrementan la biomasa de altamisa pero por el efecto del herbicida la acumulación ($g\ m^{-2}$) de aleloquímicos (aceite esencial o artemisinina) se reduce, pero se incrementa su concentración en las H e I”.***

La oferta de recursos (*i.e.* luz, nutrientes) y los factores del ambiente (*i.e.* temperatura, suelo), generan cambios en la composición de los aceites esenciales (Sangwan *et al.*, 2001). Gil *et al.* (2002) hallaron variaciones en la composición del aceite esencial de *Coriandrum sativum* L. en respuesta a un gradiente de recursos generado a través de la elección del sitio de producción, nivel de fertilización y grado de enmalezamiento. Esta variación estuvo asociada a la proporción relativa de los constituyentes y no a la presencia/ausencia de un compuesto en particular. Estos resultados coinciden con los hallados en el Capítulo 3, donde los componentes del aceite esencial de altamisa respondieron de manera diferencial a la densidad y herbicida. Por ejemplo, el epoxi-mirceno estuvo asociado a los tratamientos sin herbicida y bajas densidades (*D2 H-*) y el alfa-canfolenal se relacionó con las plantas de monocultura de altamisa (*D5*) con herbicida para el 2006, y sin presencia del herbicida en el año 2007. Estos compuestos podrían ser indicadores de condiciones con o sin herbicida y del nivel de competencia ejercido por altamisa.

Dada la complejidad de los compuestos que conforman del aceite esencial en altamisa, de los cuales se desconocen las rutas metabólicas involucradas, las diferencias en composición podrían ser explicadas, por un lado, a través de la variabilidad interanual de la oferta ambiental como ser la radiación incidente, dado que este factor incide sobre la fotosíntesis, un componente importante del mecanismo fisiológico de la producción de estos compuestos (Sangwan *et al.*, 2001). Por el otro, el efecto del estrés del glifosato, podría incidir sobre los precursores o intermediarios del aceite esencial (Fisher *et al.*, 1986), o sobre la síntesis de aminoácidos aromáticos por inhibición parcial de la enzima EPSPS (shiquimato-3-fosfato fosfoenolpiruvato sintetasa), conduciendo a un reaordenamiento en el uso del carbono (Zablotowicz y Reddy, 2004), entre las vías del metabolismo secundario de la altamisa.

Asimismo, estas diferencias en la composición de los aleloquímicos, podrían generar cambios en las señales químicas (Callaway, 2002) que perciben otros componentes del agroecosistema que acompañan a altamisa, como los microorganismos del suelo (Inderjit, 2005). De esta manera quedó demostrada la **hipótesis 2 (v) que postula: “Los componentes del aceite esencial responden diferencialmente al efecto combinado de la densidad y el herbicida”**.

En los experimentos en macetas (Capítulo 4) el efecto de las distintas fuentes de altamisa (biomasa seca, verde y artemisinina) y dos sustratos de suelos no generaron un efecto negativo sobre el crecimiento y el rendimiento en plantas de soja. Con respecto a la relación entre la nodulación y el rendimiento, es destacable que en *BS* y el *S_{ARCILLOSO}* se logró el máximo rendimiento (35 % mayor, con respecto al control), con la mínima biomasa y número de nódulos. No es sorprendente el mayor rendimiento encontrado en este tratamiento, dado el sistema nodular desarrollado en las plantas (mayor número y biomasa de nódulos) asociados a una mayor fijación de N (Imsande, 1986). Sin embargo, resulta llamativo que en el tratamiento *BV* y *S_{ARCILLOSO}* se haya alcanzado el mismo rendimiento de soja con un menor sistema nodular (menor número y biomasa de nódulos). Esto puede deberse por un lado, a que la fuente de altamisa en *BV* haya retrasado la formación de nódulos (Rice *et al.*, 1981) comparado con *BS* independientemente del sustrato y por el otro, que el nivel de N en la planta en *BV* se haya suplido por un mayor crecimiento radical en el *S_{ARCILLOSO}* dado el costo energético menor involucrado en este proceso (Salvagiotti *et al.*, 2008). Estos hallazgos permiten aceptar la **hipótesis 3** postulada: **“Distintas fuentes de altamisa (biomasa de altamisa verde, seca y artemisinina pura) y el tipo de sustrato (arcilloso o arenoso) impactan de manera diferencial sobre las concentraciones y la actividad de los aleloquímicos que se aportan al suelo. Esto produce variaciones en el modo en que se generan los efectos sobre el crecimiento, la nodulación o el rendimiento de plantas de soja”**.

Experimentaciones en laboratorio, evidencian el efecto negativo de los aleloquímicos provenientes de *A. annua* (Stiles *et al.*, 1994; Romagni *et al.*, 2000; Abraham *et al.*, 2003, Burt, 2004). En línea con estos resultados, en el Capítulo 5 se demostró que la artemisinina a altas dosis (*A3*) y el aceite esencial provenientes de altamisa, y su interacción, redujeron el crecimiento de *B. japonicum*. Por el contrario, las bajas dosis de artemisinina *A1* y *A2*, no trajo aparejado disminuciones importantes en el crecimiento (UFC) de la bacteria. Este mismo efecto sobre *B. japonicum* se encontró con bajas dosis de aleloquímicos provenientes de otras especies de malezas como *C. album* y *S. viridis* (Mallik y Williams (2005). Estos resultados permiten aceptar la **hipótesis 4 (i)** descripta: **“Los aleloquímicos de altamisa (aceite esencial y artemisinina) influyen directa y negativamente sobre el crecimiento de *Bradhyrizobium japonicum*”**. De acuerdo a Einhelling (1999) el efecto de interacción de los aleloquímicos (*A2xE1*) sobre el crecimiento del simbionte fue mayor que sus factores individuales, condición que permite aceptar la **hipótesis 4 (ii): “El efecto de interacción de la esencia y artemisina sobre el crecimiento de la bacteria *B. japonicum* es mayor que sus efectos individuales”**.

En esta tesis se demostró la importancia de considerar cada nivel de organización (*e.g.* celular, organismo, poblaciones) como una propiedad emergente (*i.e.* resultado del efecto no lineal de la interacción entre los componentes de un sistema) del nivel superior y condicionado por el nivel inferior (Jackson, 1984). Así la ocurrencia de un efecto alelopático negativo en condiciones controladas de laboratorio demuestran la expresión de ciertos mecanismos, que no necesariamente se expresan en un nivel superior, como los son los sistemas naturales a campo (Ridenour y Callaway, 2001),

De esta manera y comparando los resultados del último capítulo (Capítulo 5) con los anteriores, se puede destacar en condiciones de laboratorio, un efecto sinérgico negativo *A2xE1 de los aleloquímicos* sobre *B. japonicum*. Mientras que a *nivel de organismo* (experimento en macetas, Capítulo 4), y a *nivel de población* (Capítulos 2 y 3), las altas densidades de altamisa exploradas a campo (*D4*) y los niveles de aleloquímicos en el suelo (Capítulo 3) no causaron un efecto negativo sobre el crecimiento y el rendimiento en soja. Estas diferencias podrían deberse en gran parte, a que el componente suelo actúe como buffer de las sustancias alelopáticas (Inderjit *et al.*, 2001) y en consecuencia su disponibilidad hacia el organismo receptor (*i.e* bacteria, planta) sea menor (Kaur *et al.*, 2009). Por otro lado, hay que destacar que la nodulación (que involucra desde la infección, crecimiento, fijación y respuesta del hospedante al simbionte) y el crecimiento bacteriano podrían tener diferentes umbrales de respuesta a los aleloquímicos. Sin embargo, no se esperaba que el patrón de respuesta de ambos procesos fuese diferente. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de estudiar las interacciones competitivas, alelopáticas y de mutualismo en condiciones de campo, dado que éstas interacciones podrían cambiar no solo el tipo de respuesta sino el sentido de la misma, según en el nivel de organización donde se estudien (Jackson, 1984).

6.2 AVANCES LOGRADOS EN EL CONOCIMIENTO

Los ensayos conducidos en condiciones muy similares a las de producción a campo, hacen fácilmente extrapolables los hallazgos a cultivos comerciales de soja y hace más confiable la aplicación agronómica de los conocimientos generados. La presencia de una maleza alelopática como *A. annua* en densidades de 2 a 8 plantas m², no representaría una marcada disminución en el crecimiento y rendimiento de soja. Es por ello, que a pesar de los efectos negativos de altamisa documentados en soja (Lydon *et al.*, 1997) su control químico no estaría justificado. No obstante, densidades mayores a las evaluadas podrían operar modificando la respuesta en el cultivo. Asimismo, se evidenció la importancia de la presencia del suelo como “buffer” del nivel de respuesta entre los organismos.

La originalidad de esta tesis, reside no sólo en los resultados obtenidos, sino también en las aproximaciones utilizadas. La metodología aplicada en esta tesis para el estudio de la alelopatía en condiciones de campo, a través del uso del carbón activado aplicado subsuperficialmente en el suelo, así como la desorción de artemisinina del carbón (no efectuados por otros investigadores hasta la fecha), demostró ser una solución efectiva para lograr los objetivos de la tesis y estudiar la alelopatía en condiciones de campo.

A continuación se detallan los aportes originales más destacados de esta tesis:

1. Incidencia de la alelopatía en el sistema soja-altamisa a diferentes niveles de organización. Los resultados de esta tesis aportan una sólida evidencia acerca de que el efecto alelopático puede ser positivo, neutro o negativo dependiendo del nivel de organización que se explore y del nivel de aproximación que se utilice (Jackson, 1984). Así, desde un enfoque holístico y con las aproximaciones experimentales a campo los aleloquímicos de altamisa no tuvieron un efecto negativo sobre la soja, mientras que con un visión más reduccionista, y en condiciones controladas de laboratorio, el efecto conjunto de los aleloquímicos fue negativo.

En esta tesis se estudiaron algunos componentes importantes del agroecosistema (soja, altamisa, *Bradyrhizobium*). Sin embargo, incluir otros genotipos de soja,

quimiotipos de altamisa o microorganismos podría alterar algunas de las respuestas encontradas. Por ejemplo las micorrizas, podrían afectar la producción del aceite esencial en altamisa al incidir sobre la disponibilidad de recursos (Kapoor *et al.*, 2007). Por otra parte, no se midieron los exudados radicales dado que el quimiotipo de altamisa evaluado no contenía artemisinina en las raíces. Otro quimiotipo de altamisa que presentara otra composición de aceite esencial o exudados radicales podría hacer variar las respuestas halladas. Así como genotipos de soja de otros grupos de madurez podrían presentar diferencias fenológicas que redundaran en variaciones con respecto a las respuestas encontradas.

2. Relación entre la producción de artemisinina en la biomasa aérea de altamisa y su acumulación en el suelo. Los resultados obtenidos en el Capítulo 3 demostraron que existe una relación entre la artemisinina acumulada en hojas e inflorescencias de las plantas de altamisa y la artemisinina retenida en el suelo, cuantificada a través del carbón activado. Con este nuevo conocimiento y particularmente en el caso de la maleza altamisa, podría generarse un modelo para predecir la acumulación de artemisinina en el suelo, a partir de la producción de biomasa aérea de altamisa en parcelas de campo, sin necesidad de utilizar adsorbentes y luego desorber el compuesto para su cuantificación. Este resultado resulta muy valioso, dado que por ejemplo, otros cultivos como el maíz presentan sensibilidad a la artemisinina (Debalays *et al.*, 2008). De esta manera, se podría estimar a campo el efecto que este compuesto genera sobre la emergencia y altura de plantas de maíz sobre la base de la biomasa aérea de altamisa.

3. Utilización del carbón activado como adsorbente de aleloquímicos en parcelas experimentales. Los resultados obtenidos en esta tesis revelan que la aplicación del carbón activado en las parcelas a campo, fue una herramienta útil que permitió adsorber el aleloquímico de interés: la artemisinina. Existen numerosos trabajos que remarcan la importancia de cuantificar las interferencias, entre ellas, la competencia y la alelopatía a campo y, la técnica utilizada fue efectiva para este fin.

4. Cuantificación del aleloquímico artemisinina adsorbido en el carbón activado. Muchos de los experimentos utilizan carbón activado para discriminar la alelopatía de la competencia en condiciones de campo. Sin embargo, esta es la primera evidencia de la utilización del carbón activado en las parcelas experimentales y de la posterior cuantificación del aleloquímico artemisinina, adsorbido en el carbón activado. Asimismo, numerosos trabajos en los que se utilizaron adsorbentes (arcillas, carbón activado), no han logrado cuantificar con éxito las moléculas adsorbidas. Esto podría deberse a señales químicas muy bajas para ser detectadas con un instrumental (Umbral mínimo de detección) como el HPLC o CG (Cromatografía gaseosa); o bien, a técnicas de desorción inadecuadas para el compuesto que se intenta cuantificar.

6.3 IMPLICANCIAS AGRONÓMICAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Distinguir y cuantificar los efectos de la alelopatía y la competencia en condiciones de campo permitirá una mejor comprensión de las relaciones maleza-cultivo, y por lo tanto, un mejor manejo de los sistemas agrícolas.

Los resultados derivados de esta tesis, aportan elementos para ajustar los umbrales de daño y las dosis de herbicidas como así también contar con herramientas de predicción adicionales a las actualmente disponibles a la hora de tomar decisiones con respecto al manejo de los agroecosistemas.

Por otro lado, el conocimiento del efecto de dosis subletales de herbicida sobre las relaciones de competencia y alelopatía en el sistema cultivo-maleza, como las que pueden ocurrir por deriva o incorrecta aplicación, es de fundamental importancia para realizar un manejo más sustentable del agroecosistema. Es por ello que los resultados obtenidos en esta tesis, indican que el herbicida utilizado para reducir la interferencia de la maleza sobre la soja, puede tener un efecto muy distinto cuando la interacción alelopática es importante.

Asimismo, dilucidar las interacciones alelopáticas tiene un interés realmente práctico. Entender como funciona este fenómeno podría ayudar a utilizar mulches, cultivos de cobertura y rotaciones que permitan controlar otras especies de malezas a campo, sin afectar por ejemplo, el rendimiento de un cultivo de soja, y además replantearse problemas derivados de la autotoxicidad de malezas alelopáticas.

6.4 IMPLICANCIAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

De la tesis realizada surgen nuevos interrogantes y líneas de investigación:

1. Efectos fitotóxicos de otros compuestos alelopáticos sobre el cultivo de soja.

Si bien en esta tesis se evaluaron el efecto de los terpenos volátiles y no volátiles como la artemisinina, existen otros tipos de compuestos como la “arteether” un derivado de la artemisinina que se le atribuyen efectos más tóxicos sobre la germinación de especies como *Portulaca oleracea*, *Amaranthus blitum*, *Raphanus sativus* L. (Bagchi *et al.*, 1997).

2. Estudio de *Artemisia annua* como cultivo y efecto del estrés biótico y abiótico sobre la producción de artemisinina. Debido a la importancia de *A. annua* como cultivo y que esta especie es sensible a estreses bióticos y abióticos. Resulta interesante evaluar de qué manera este tipo de estreses generan un aumento en la producción y concentración de aceites esenciales y artemisinina, dada la importancia de estos metabolitos secundarios en la industria farmacéutica y medicinal.

3. Formulación de herbicidas que contengan metabolitos secundarios provenientes de altamisa. Dado que en los ensayos a campo, los metabolitos secundarios de altamisa demostraron no tener un efecto negativo sobre la soja, pero sí se sabe que tienen efectos sobre otras especies de malezas, podrían desarrollarse formulaciones de herbicidas para este cultivo de soja que contengan como principio activo algunos de los metabolitos provenientes de altamisa.

4. Análisis de otros componentes del Agroecosistema: Microorganismos y Consumidores. Es importante destacar la presencia de otros eventuales actores presentes en el agroecosistema que no han sido tratados, dada la complejidad de las múltiples interacciones en los agroecosistemas. Es por ello, que surge la pregunta de cual es la intervención de los consumidores (*i.e.* herbívoros, depredadores) u otro tipo de microorganismos del suelo (*e.g.* micorrizas arbusculares en altamisa), sobre la producción de los metabolitos secundarios y su relación con el cultivo.

5. Cambios en la dinámica de liberación de los aleloquímicos en el ambiente debido a un estrés biótico y abiótico. Otra pregunta interesante que se deduce de la presente tesis, es la cuantificación de los terpenos volátiles y no volátiles que se liberan al ambiente aéreo y edáfico de altamisa a través del tiempo. Dado que el proceso de liberación de los aleloquímicos es muy dinámico, sería muy interesante cuantificar los terpenos que se liberan al medio ambiente cuando se aplica algún grado de estrés. Y de

que manera, el tipo de estrés aplicado influye sobre la especie receptora de éstos aleloquímicos.

6.5 APLICACIONES FUTURAS

A pesar de las dificultades que existen en estudiar y evaluar la interferencia alelopática en ambientes naturales, este estudio provee fuerte evidencia de la existencia de efectos positivos de la alelopatía sobre la competencia entre altamisa y un cultivo de soja en condiciones de campo. A futuro, es necesario desarrollar nuevos experimentos con una visión holística del sistema como la desarrollada en esta tesis, integrando las distintas especies productoras de compuestos alelopáticos y evaluando sus efectos sobre las especies receptoras en condiciones naturales. Por otra parte habrá que concentrar esfuerzos en realizar análisis de la dinámica de los aleloquímicos en los sistemas, puesto que hasta ahora los mismos se han centrado en análisis estáticos (Staman *et al.*, 2001), y aunque esto ha generado importantes avances en el conocimiento no dejan de ser estudios focalizados en una parte puntual del sistema. De esta manera, son necesarios más esfuerzos interdisciplinarios que involucren la ecología, la fisiología, la bioquímica, la ciencia del suelo y la microbiología, que puedan dirigir esta compleja área de estudio a fin de responder preguntas claves relacionadas con las interferencias que devienen en las malezas asociadas a un cultivo en condiciones de campo. Realizar esta integración, plantea retos teóricos y empíricos relevantes en éste área de estudio.

Desde el punto de vista de la producción, la maleza alopática altamisa no mostró un impacto negativo sobre la producción de soja dentro de las densidades de la maleza exploradas (2 a 8 plantas m⁻²) y sin limitantes hídrica y nutricionales edáficas. Es por ello, que bajo condiciones no limitantes de agua y nutrientes, su control a través de herbicidas, no estaría justificado.

Desde el punto de vista del manejo de los agroecosistemas, conocer con mayor profundidad los efectos de los aleloquímicos y las prácticas de manejo (*i.e.* aplicación de herbicidas, densidad) sobre el cultivo de soja, contribuirá al diseño de prácticas que eviten o minimicen las consecuencias negativas y potencien las positivas al sistema, con el fin de lograr un manejo agrícola más sustentable. Por ejemplo, en zonas de producción de soja con problemas de erosión (*e.g.* hídrica), el uso de mulches provenientes de altamisa, podría tener múltiples ventajas: reducción del proceso erosivo, disminución en la emergencia de otras especies de malezas, mayor eficiencia en el uso del agua por el cultivo, y otro aspecto no menor a destacar es la incidencia positiva o neutra de la altamisa sobre la soja, entre otros. Otra práctica cultural que ha despertado interés en muchos agricultores son los policultivos, dada su importancia en el incremento de la productividad y el uso más eficiente de los recursos en los ambientes productivos. De acuerdo a los hallazgos en esta tesis, la altamisa podría formar parte de un componente en los policultivos, como una especie productora de aceite esencial, favoreciendo la biodiversidad y eventualmente, el manejo de plagas, obteniéndose los beneficios del mantenimiento de las funciones que permiten la sustentabilidad de los agroecosistemas (*e.g.* funcionalidad dada por la repulsión o atracción que altamisa genera sobre los artrópodos, en un sistema soja-altamisa, Lenardis *et al.*, 2011) y sin comprometer el rendimiento del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abraham D., Francischini A.C., Pergo E.M., Kelmer-Bracht A.M. y Ishii-Iwamoto E.L. 2003. Effects of alpha-pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 985-991.
- Adams R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass Spectrometry, 4° ed. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois.
- Albuquerque M.B., Dos Santos R.C., Lima L.M., Melo Filho P de A., Nogueira R.J.M.C., Camara C.A.G. y Ramos A. de R. 2011. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 31: 379-395.
- Aldrich R.J. 1984. *Weed Crop Ecology: Principles in Weed Management*. Breton Publishers, North Scituate, MA.
- Aldrich R.J. 1987. Predicting crop yield reductions from weeds. *Weed Technology* 1(3): 199-206.
- Alvarez R., Gutierrez Boem F. y Rubio G. 2007. Recomendación de fertilización. Pp. 63-77 en Alvarez R. (ed.) Fertilización de cultivos de granos y pasturas. Diagnóstico y recomendación en la región pampeana. 2° ed. Facultad de Agronomía. Buenos Aires.
- Anaya A.L., Mata R., Rivero-Cruz F., Hernández-Bautista B.E. Chávez-Velasco D. y Gómez-Pompa A. 1999. Allelochemicals potencial of *Metopium brownei*. *Journal of Chemical Ecology* 25 (1): 141-156.
- Anaya A.L. 2006. Allelopathic organisms and molecules: promising bioregulators for the control of plant diseases, weeds, and other pests. Pp. 31-78 en Inderjit y Mukerji (eds.) *Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases*. Springer. Netherlands.
- Arthur W. y Mitchell P. 1989. A revised scheme for the classification of population interactions. *Oikos* 56:141-143.
- Azania A.A.P.M., Azania C.A.M., Alves P.L.C.A., Palaniraj R., Kadian H.S., Sati S.C., Rawat L.S., Dahiya D.S. y Narwal S.S. 2003. Allelopathic Plants.7. Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Allelopathic Journal* 11 (1): 1-20.
- Baca B.E., Soto Urzúa L. y Pardo Ruiz M.P.A. 2000. Fijación biológica del nitrógeno. *Elementos* 38: 43-49.
- Bagchi G.D., Jain D.C. y Kumar S. 1997. Arteether, a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 45: 1131-1133.
- Bagchi G.D., Haider F., Dwivedi P.D., Singh A. y Naqvi A.A. 2003. Essential oil constituents of *Artemisia annua* during different growth periods at monsoon conditions of subtropical north Indian plains. *Journal of Essential Oil Research* 15: 248-250.
- Barney J.N., Hay A.G. y Weston L.A. 2005. Isolation and characterization of allelopathic volatiles from mugwort (*Artemisia vulgaris*). *Journal of Chemical Ecology* 31(2): 247-265.
- Batish R.D., Lavanya K., Singh H.P. y Kohli R.K. 2007. Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea. *Plant Growth Regulation* 51(2): 119-128.
- Batlang U. y Shushu D.D. 2007. Allelopathic activity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) on growth and nodulation of bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.). *Journal of Agronomy* 6 (4): 541-547.

- Bernays E.A. y Chapman R.F. 1994. *Host-plant selection by phytophagous insects*. Chapman and Hall, New York.
- Bever D.J. 2003. Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist* 157: 465-473.
- Bhowmik P.C. y Doll J.D. 1979. Evaluation of allelopathic effects of selected weeds species on corn and soybean. *Proceedings North Center Weed Control Conference* 34: 43-45.
- Bhowmik P.C. y Doll J.D. 1982. Corn and soybean response to allelopathic effects of weed and crop residues. *Agronomy Journal* 74: 601-606.
- Bhowmik P.C. y Doll J.D. 1984. Allelopathic effects of annual weed residues on growth and nutrient uptake of corn and soybean. *Agronomy Journal* 76: 383-388.
- Biere A., Marak H.B. y van Damme J.M.M. 2004. Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs? *Oecologia* 40: 430-441.
- Birkett M.A., Chamberlain K., Hooper A.M. y Pickett J.A. 2001. Does allelopathy offer real promise for practical weed management and for explaining rhizosphere interactions involving higher plants? *Plant and Soil* 232: 31-39.
- Blair A.C., Weston L.A., Nissen S.J., Brunk G.R. y Hufbauer R.A. 2009. The importance of analytical techniques in allelopathy studies with the report allelochemicals catechin as an example. *Biological Invasions* 11: 325-332.
- Blanco J.A. 2007. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models. *Ecological Modelling* 209: 65-77.
- Blum U., Shafer S.R. y Lehmen M.E. 1999. Evidence for inhibitory interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs experimental model. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 673-693.
- Booth B.D., Murphy S.D. y Swanton C.J. 2003. *Weed Ecology in Natural and Agricultural Systems*. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK.
- Bray R.H. y Kurtz L.T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59: 39-45.
- Brown G.D. 2010. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules* 15: 7603-7698.
- Buchanan G.A., Crowley R.H., Street J.E. y McGuire J.A. 1980. Competition of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) and redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) with cotton (*Gossypium hirsutum*). *Weed Science* 28: 258-262.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-53.
- Callaway R.M. 1994. Facilitative and interfering effects of *Arthrocnemum Subterminale* on winter annuals. *Ecology* 75: 681-686.
- Callaway R.M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61: 306-349.
- Callaway R.M. y Aschehoug E.T. 2000 Invasive plant versus their new and old neighbours: a mechanism for exotic invasion. *Science* 290: 521-523.
- Callaway R.M. 2002. The detection of neighbors by plants. *Trends in Ecology and Evolution* 17:104-105.
- Canner S.R., Wiles L.J. y McMaster G.S. 2002. Weed reproduction model parameters may be estimated from crop yield loss data. *Weed Science* 50: 763-772.
- Cavar S., Maksimovic M, Vidic D. y Paric A. 2012. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products* 37: 479-485.

- Charles D.J., Simon J.E., Wood K.V. y Heinstein P. 1990. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. *Journal of Natural Products* 53: 157-160.
- Charles D.J., Simon J.E., Shock C.C., Feibert E.B.G. y Smith R.M. 1993. Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L. Pp. 628-631 en Janick J. y Simon J.E. (eds.) *New crops*. Wiley, New York.
- Chaves Lobón N., Alias Gallego J.C., Sosa Diaz T. y Escudero García J.C. 2002. Allelopathic potential of *Cistus ladanifer* chemicals in response to variations of light and temperature. *Chemoecology* 12(3): 139-145.
- Chen P. y Leather G.R. 1990. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *Journal of Chemical Ecology* 16: 1867-1876.
- Chouliaras N., Gravanis F., Vasilakoglou I., Gougoulas N., Vagelas I., Kapotis T. y Wogiatzi E. 2007. The effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) on soil organic matter biodegradation and other soil properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 2416-2419.
- Clevenger J.F. 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmacists Association* 17: 346-349.
- Connell J.H. 1990. Apparent versus "real" competition in plants. Pp: 9-26 en Grace J.B. y Tilman D. (eds.) *Perspectives on plant competition*. Academic Press, San Diego, California.
- Connolly J., Wayne P. y Bazzaz F.A. 2001. Interspecific competition in plants: how well do current methods answer fundamental questions? *American Naturalist* 57: 107-125.
- Costanza R. 1980. Embodied energy and economic valuation. *Science* 210: 1219-1224.
- Cousens R. 1985. An empirical model relating crop yield to weed and crop density and statistical comparison with other models. *Journal of Agricultural Science* 105: 513-521.
- Cousens R. 1991. Aspects of the design and interpretation of competition (interference) experiments. *Weed Technology* 5(3): 664-673.
- Dayan F.E., Hernandez A., Allen S.N., Moraes R.M., Vroman J.A., Avery M.A. y Duke S.O. 1999. Comparative phytotoxicity of artemisinin and several sesquiterpene analogs. *Phytochemistry* 50: 607-614.
- Damtew Z., Tesfaye B. y Bisrat D. 2011. Leaf, essentials oil and artemisinina yield of *Artemisia* (*Artemisia annua* L.) as influenced by harvesting age and plant population density. *World Journal of Agricultural Sciences* 7 (4): 404-412.
- Dawson J.O. y Seymour P.E. 1983. Effects of juglone concentration on growth in vitro of *Frankia* ArI3 and *Rhizobium japonicum* strain 71. *Journal of Chemical Ecology* 9(8): 1175-1183.
- de la Fuente E.B., Suárez S.A., Ghera C.M. y Leon R.J.C. 1999. Soybean weed communities: relationships with cultural history and crop yield. *Agronomy Journal* 91: 234-241.
- de la Fuente E.B., Suárez S.A. y Ghera C.M. 2006. Soybean weed community composition and richness between 1995 and 2003 in the Rolling Pampas (Argentina). *Agriculture Ecosystems and Environment* 115: 229-236.
- de la Fuente E.B., Perelman S. y Ghera C.M. 2010. Weed and arthropod communities in soybean as related to crop productivity and land use in the Rolling Pampa, Argentina. *Weed Research* 50: 561-571.
- de Magalhães P.M., Pereira B. y Sartoratto A. 2004. Yields of antimalarial *Artemisia annua* L. species *Acta Horticulture Proceedings* (ISHS) 629: 421- 424.

- De Moraes C.M., Schultz J.C., Mescher M.C. y Tumlinson J.H. 2004. Induced plant signaling and its implications for environmental sensing. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 67: 819-834.
- de Wit C.T. 1960. On competition. Versl. Landbouwk. Onderz. 66: 1-82.
- Delabays N. 1997. Biologie de la reproduction chez l'*Artemisia annua* L. et génetique de la production en artemisinin. Contribution à la domestication et à l'amélioration génétique de l'espèce. Thèse de Doctorat, Université de Lausanne.
- Delabays N., Simonnet X. y Gaudin M. 2001. The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. *Current Medicinal Chemistry* 8: 1795-1801.
- Delabays N., Slacanin I. y Bohren C. 2008. Herbicidal potential of artemisinin and allelopathic properties of *Artemisia annua* L.: from the laboratory to the field. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Special Issue 21: 1861-4051.
- Dilworth, M.J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 127: 285-294.
- Dudai N., Chaimovitch D., Larkov O., Fisher R. Blaicher Y. y Mayer A.M. 2009. Allelochemicals released by leaf residues of *Micromeria fruticosa* in soils, their uptake and metabolism by inhibited wheat seed. *Plant and Soil* 314: 311-317.
- Duke S.O., Vaughn K.C., Croom E.M. y Elshohly N.H. 1987. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. *Weed Science* 35: 499-505.
- Duke S.O. 1988. Glyphosate. Pp. 1-70 en Kearney P.C. y Kaufman D.D. (eds.) *Herbicides: chemistry, degradation, and mode of action*. Marcel Dekker, New York.
- Duke S.O. y Dayan F.E. 2006. Modes of action of phytotoxins from plants. Pp. 511-536 en: Reigosa M.J., Pedrol N. y González L. (eds.) *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer, Netherlands.
- Duke S.O. y Powles S.B. 2009. Glyphosate-Resistant Crops and Weeds: Now and in the Future. *AgBioForum* 12 (3 y 4): 346-347.
- Eberbach P.L. y Douglas L.A. 1989. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum* L. *Plant and Soil* 119:15-23.
- Einhelling, F.A. 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. Pp. 171-188 en Putnam A.R. y Tang C. S. (eds.) *The Science of allelopathy*. John Wiley and Sons. New York.
- Einhelling F.A. 1996. Interactions involving allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal* 88: 886-893.
- Einhelling F.A. 1999. An integrated view of allelochemicals and multiple stresses. Pp. 479-494 en: Inderjit, Dakshini K.M.M. y Foy C.L. (eds.) *Principles and practices in Plant Ecology, Allelochemical interactions*. CRC Press.
- Einhelling F.A. 2001. The physiology of allelochemical action: clues and views. *First European Allelopathy Symposium*, Vigo, Spain, June 21-23.
- El-Hendawy S.E., Hu Y. y Schmidhalter U. 2005. Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 123-143.
- Faccini D. y Puricelli E. 2007. Efficacy of herbicide dose and plant growth stage on weeds present in fallow ground. *Agriscientia* 24(1): 29-35.
- Farmacopea Europea. 1997. Maisonnneuve, Sante Ruffine.

- Fehr W.R. y Caviness C.E. 1977. *Stages of soybean development*. Special Report 80. Iowa State University, Ames, Iowa.
- Ferreira, J.F.S. y Janick J. 1995. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *International Journal of Plant Sciences* 156: 807-815.
- Ferreira J.F.S., Simon J.E. y Janick J. 1995. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Medica* 61: 167-170.
- Ferreira J.F.S., Laughlin J.C., Delabays N. y de Magalhães P.M. 2005. Cultivation and genetics of *Artemisia annua* for increased production of the antimalarial artemisinin. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation* 3: 206-229.
- Firbank L.G. y Watkinson A.R. 1990. On the effects of competition: from monocultures to mixtures. Pp. 165-192 en Grace J.B. y Tilman D. (eds.) *Perspectives on Plant Competition*. Academic Press, London.
- Fisher R.S., Berry A., Gaines C.G. y Jensen R.A. 1986. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. *Journal of Bacteriology* 168: 1147-1154.
- Frappell, B.D. 1979. Competition in vegetable crop communities. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 45 (4): 211-217.
- Gaudin M. y Simonnet X. 2002. Dosage de l'artémisinine par chromatographie sur couche mince (CCM). *Revue Suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 34(3): 205-208.
- Gershenzon J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. *Recent Advances in Phytochemistry* 18: 273-320.
- Gershenzon, J. y Croteau R. 1991. Terpenoids. Pp. 165-219 en Rosenthal G.A. y Berenbaum M.R. (eds.) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press, San Diego, CA.
- Gershenzon J., McConkey M.E y Croteau R.B. 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology* 122: 205-213.
- Gianoli, E. 2004. Plasticity of traits and correlations in two populations of *Convolvulus arvensis* (Convolvulaceae) differing in environmental heterogeneity. *International Journal of Plant Sciences* 165:825-832.
- Gil A., de la Fuente E.B., Lernardis A.E., López Pereira M., Suárez S.A., Bandoni A., Van Baren C., Di Leo Lira P. y Ghersa C.M. 2002. Coriander essential oil composition from two genotypes grown in different environmental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2870-2877.
- Golberg D.E. y Werner P.A. 1983. Equivalence of competitors in plant communities: a null hypothesis and a field experimental approach. *American Journal of Botany* 70: 1098-1104.
- Goldberg D.E. 1990. Components of resource competition in plant communities. Pp. 27-49 en Grace J.B. y Tilman D. (eds.) *Perspectives on Plant Competition*. Academic Press, San Diego.
- Grace J.B. y Tilman D. 1990. *Perspectives on Plant Competition*. Academic Press, San Diego.
- Guo C., Liu C.Z., Ye H.C. y Li G.F. 2004. Effect of temperature on growth and artemisinin biosynthesis in hairy root cultures of *Artemisia annua*. *Acta Bot Boreal Occident Sinica* 24: 828-831.
- Gupta S.K., Singh P., Bajpai P., Ram G., Singh D., Gupta M.M., Jain D.C., Khanuja S.P. y Kumar S. 2002. Morphogenetic variation for artemisinin and volatile oil in *Artemisia annua*. *Industrial Crops and Products*. 16: 217-224.

- Hall A.B., Blue U. y Fites R.C. 1982. Stress modification of allelopathy of *Helianthus annuus* L. debris on seed germination. *American Journal of Botany* 69: 776-783.
- Harborne J.B. 1997. Biochemical plant ecology. Pp. 503-516 en: Dey P.M. y Harborne J.B. (eds.) *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego.
- Harper J.R. y Balke N. 1981. Characterization of the inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. *Plant Physiology* 68: 1349-1353.
- Harper S.M., Edwards D.G., Kerven G.L. y Asher C.J. 1995. Effects of organic acid fractions extracted from *Eucalyptus camaldulensis* leaves on root elongation of maize (*Zea mays*) in the presence and absence of aluminium. *Plant and Soil* 171: 189-192.
- Hay R.K., y Waterman P.G. 1993. *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*. Longman Scientific and Technical, Essex, England.
- Heckman J.R. y Kluchinski D. 1995. Soybean nodulation and nitrogen fixation on soil amended with plant residues. *Biology and Fertility of Soils* 20: 284-288.
- Herbert R.B. 1981. Capítulo 2. Techniques for biosynthesis. Pp. 16-29 en Herbert R.B. (ed.) *The biosynthesis of secondary metabolites*. Chapman and Hall, London.
- Hermes D.A. y Mattson W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology* 67: 284-335.
- Hernández A., García-Plazzola J.I. y Becerril J.M. 1999. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2920-2925.
- Holzappel C. y Mahall B.E. 1999. Bidirectional facilitation and interference between shrubs and annuals in the Mojave Desert. *Ecology* 80: 1747-1761.
- Hyman M. y Dupont R.R. 2001. *Groundwater and soil remediation-process design and cost estimating of proven technologies*. ASCE Press, Reston, Virginia, USA.
- Imsande J. 1986. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. *Journal of Experimental Botany* 37(176): 348-355.
- Inderjit y del Moral R. 1997. Is separating resource competition from allelopathy realistic? *Botanical Review* 63(3): 221-230.
- Inderjit y Foy C.L. 1999. Nature of the interference mechanism of mugwort (*Artemisia vulgaris*). *Weed Technology* 13: 176-182.
- Inderjit y Weston L.A. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? *Journal of Chemical Ecology* 26: 2111-2118.
- Inderjit 2001. Soils: environmental effect on allelochemicals activity. *Agronomy Journal* 93: 79-84.
- Inderjit y Weiner J. 2001. Plant allelochemical interference or soil chemical ecology? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 4: 4-12.
- Inderjit, Kaur M. y Foy C.L. 2001. On significance of field studies in allelopathy. *Weed Technology* 15: 792-797.
- Inderjit y Mallik A.U. 2002. Can *Kalmia angustifolia* interference to black spruce (*Picea mariana*) be explained by allelopathy? *Forest Ecology and Management* 160: 75-84.
- Inderjit y Callaway R.M. 2003. Experimental designs for the study of allelopathy. *Plant and Soil* 256: 1-11.
- Inderjit y Nilsen E.T. 2003. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22: 221-238.
- Inderjit 2005. Soil microorganisms: An important determinant of allelopathy activity. *Plant and Soil* 274: 227-236.

- Inderjit, Saini M. y Kaur H. 2005. Experimental complexities in evaluating the comparative phytotoxicity of chemicals with different modes of action. *Environmental & Experimental Botany* 53: 97-104.
- Jackson, W. 1984. A Search for the unifying concept for sustainable agriculture. Pp. 209-229 en Jackson W., Berry W. y Coleman B. (dds.) *Meeting the Expectations of the Land*. San Francisco: North Point.
- Jafari M., Kohandel A., Baghbani Sh., Tavili A., Zare Chahouki M.A., Malekian A. y Asadi Pasoojani N. 2011. Comparison of chemical characteristics of shoot, root and litter in three range species of *Salsola rigida*, *Artemisia sieberi* and *Stipa barbata*. *Caspian Journal of Environmental Science* 9 (1): 37-46.
- James R. y Lockwood M. 1998. Economics of blackberries, current data and rapid valuation techniques. *Plant Protection Quarterly* 13(4): 175-179.
- Jessing K.K., Cedergreen N., Jensen J. y Hansen H.C.B. 2009. Degradation and ecotoxicity of the biomedical drug artemisinin in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(4): 701-710.
- Jongman R.H.G., ter Braak C.J.F. y van Tongeren O.F.R. 1995. *Data analysis in community and landscape ecology*, 2° ed., Pudoc, Wageningen.
- Kapoor R., Chaudhary V. y Bhatnagar, A.K. 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza* 17: 581-587.
- Karr D.B., Emerich D.W. y Karr A.L. 1992. Accumulation of the phytoalexin, glyceollin, in root nodules of soybean formed by effective and ineffective strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Chemical Ecology* 18(7): 997-1008.
- Kaur H., Kaur R., Kaur S., Baldwin I.T. e Inderjit. 2009. Taking ecological function seriously: soil microbial communities can obviate allelopathic effect of released metabolites. *Plos One* 4(3): e4700. doi:10.1371/journal.pone.0004700.
- Kelsey R.G. y Everett R.L. 1995. Allelopathy. Pp. 479-549 en Bedunah D.J. y Sosebee R.E. (eds.) *Wild Land Plants: Physiological Ecology and Developmental Morphology*. Society for Range Management. USA.
- Khorshidi J., Tabatabaei M.F., Omidbaigi R. y Sefidkon F. 2009. Effect of densities of planting on yield and essential oil components of Fennen (*Foeniculum vulgare*). *Journal of Agricultural Science* 1(1): 152-609.
- Kira T., Ogawa H. y Sakazaki N. 1953. Intraspecific competition among higher plants. I. Competition-yield-density interrelationship in regularly dispersed populations. *Journal of the Institute of Polytechnics, Osaka City University* 4: 1-16.
- Klayman D.L. 1993. *Artemisia annua*: from weed to respectable antimalarial plant. Pp. 242-255 en Kinghorn A.D. y Balandrin M.F. (eds.) *Human medicinal agents from plants*. American Chemical Society Symposium Series. ACS, Washington, DC.
- Kohli R.K., Singh H.P. y Batish D. 2001. *Allelopathy in agroecosystems*. New York, Food Products Press.
- Kong C., Hu F., Xu T. y Lu Y. 1999. Allelopathic potential and chemical constituents of volatile oil from *Ageratum conyzoides*. *Journal of Chemical Ecology* 25 (10): 2347-2356.
- Kordali S., Aslan I., Çalmaşur O. y Cakir A. 2006. Toxicity of essentials oils from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products* 23: 162-170.
- Koricheva J. 1999. Interpreting phenotypic variation in plant allelochemistry: problems with the use of concentrations. *Oecologia* 119: 467-473.

- Kumar S., Gupta S.K., Singh P., Bajpai P., Gupta M.M., Singh D., Gupta A.K., Ramb G., Shasany A.K., Sharma S. 2004. High yields of artemisinin by multi-harvest of *Artemisia annua* crops. *Industrial Crops and Products* 19: 77-90.
- Laciar A., Vaca Ruiz M.L., Carrizo Flores R. y Saad J.R. 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae). *Revista Argentina de Microbiología* 41: 226-231.
- Lambers H., Chapin III F.S. y Pons T.L. 1988. Growth and allocation. Pp. 299-351 en: *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, Nueva York.
- Lau J.A., Puliafico K.P., Kopshever J.A., Steltzer H., Jarvis E.P., Schwarzländer M. y Hufbauer R.A. 2008. Inference of allelopathy is complicated by effects of activated carbon on plant growth. *New Phytologist* 178: 412-423.
- Laughlin J.C., Heazlewood G.N. y Beattie B.M. 2002. Cultivation of *Artemisia annua* L. Pp. 159-195 en Wright C.W. (ed.) *Artemisia*. Taylor and Francis, London Medicinal and Aromatic Plants, Industrials Profiles.
- Lavola A. y Julkunen-Tiito R. 1994. The effect of elevated carbon dioxide and fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). *Oecologia* 99: 315-321.
- Lenardis A., Morvillo C.M., Gil A. y de la Fuente E.B. 2011. Spontaneous communities of arthropods related to different soybean (*Glycine max.*) - wormwood (*Artemisia annua*) mixtures. *Industrial Crops and Products*. Special Number. 34: 1340-1347.
- Levitt J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses (Vol. 2). Academic Press, New York.
- Lheureux S. 2001. Etude de l'action de l'artémisinine sur le radis (*Raphanus sativus*). DEA, Université de Savoie, Chambéry, France.
- Liu C.-Z., Guo C., Wang Y. y Ouyang F. 2002. Factors influencing artemisinin production from shoot cultures of *Artemisia annua* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(5): 535-538.
- Lydon J. y Duke S.O. 1988. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36 (4): 813-818.
- Lydon J. y Duke O. 1993. The role of pesticides on host allelopathy and their effects on allelopathic compounds. Pp. 37-56 en Altam (Ed.) *Pesticide Interaction in crop production. Beneficial and Deleterious Effects*. Florida, CRC.
- Lydon J., Teasdale J.R. y Chen P.K. 1997. Allelopathic activity of annual wormwood (*Artemisia annua*) and the role of artemisinin. *Weed Science* 45(6): 807-811.
- Ma C., Wang H., Lu X., Li H., Liu B. y Xu G. 2007. Analysis of *Artemisia annua* L. volatile oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, 1150: 50-53.
- Macias F.A., Varela R.M., Torres A., Galindo J.L.G. y Molinillo J.M.G. 2002. Allelochemicals from sunflowers: chemistry, bioactivity and applications. Pp. 73-87 en: Inderjit, Mallik, A.U. (eds.): *Chemical Ecology of Plants: Allelopathy in Aquatic and Terrestrial Ecosystems*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Maddonni G.A., Ruíz RA., Vilariño P. y García de Salamone I. 2003. Capítulo 19. Fertilización en los cultivos de grano. Pp. 501-557 en Satorre E.H., Benech-Arnold R.L., Slafer G.A., Otegui M.E., de la Fuente E.B., Miralles D.J. y Savin R. (eds.) *Producción de granos. Bases funcionales para su manejo*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires.
- Mahboubi M. y Farzin N. 2009. Antimicrobial activity of *Artemisia sieberi* essential oil from central Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 1(2): 43-48.

- Mallik M.A.B. y Tesfai K. 1987. Stimulation of *Bradyrhizobium japonicum* by allelochemicals from green plants. *Plant and Soil* 103: 227-231.
- Mallik M.A.B. y Tesfai K. 1990. Isolation of a factor stimulatory to *Bradyrhizobium* in broth culture. *Plant and Soil* 128: 177-184.
- Mallik M.A.B. y Williams R.D. 2005. Allelopathic growth stimulation of plants and microorganisms. *Allelopathy Journal* 16 (2): 175-198.
- Malik A.A., Ahamad J., Mir S.R. Ali M. y Abdin M.Z. 2009. Influence of chemicals and biological treatments on volatile oil composition of *Artemisia annua* Linn. *Industrial Crops and Products* 30: 380-383.
- Malik A.A., Ahmad J., Suryapani S., Abdin M.Z. Mir S.R. y Mohammed A. 2012. Volatiles of *Artemisia annua* L. as influenced by soil application of organic residues. *Research Journal of Medicinal Plant* 6(6): 433-440.
- Mannan A., Liu C. Arsenault P.R. Towler M.J., Vail D.R., Lorence A. y Weathers P.J. 2010. DMSO triggers the generation of ROS leading to an increase in artemisinin and dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* shoot cultures. *Plant Cell Reports* 29: 143-152.
- Marchese J.A. y Rehder V.L.G. 2001. The influence of temperature in the production of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Brazilian Journal of Medicinal Plant* 4: 89-93.
- Marchese J.A. y Figueira G.M. 2005. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. *Revista Brasileira de Planta Medicinais* 7(3): 86-96.
- Marchese J.A., Ferreira J.F.S., Rehder V.L.G. y Rodrigues O. 2010. Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22(1): 1-9.
- Marco J.A. y Barbera O. 1990. Natural products from the genus *Artemisia* L. *Studies in Natural Products Chemistry* 7: 201-264.
- Mc Cune B. y Mefford M.J. 1995. PC-ORD. Multivariate analyses of ecological data. Version 2.0. MJM Software design, Gleneden Beach, OR.
- Meshnick S.R., Taylor T.E. y Kamchonwongpaisan S. 1996. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiological Reviews* 60:301-315.
- Molisch H. 1937. Der einfluss einer pflanze auf die andere-Allelopathie. Fischer, Jena.
- Moorman T.B., Becerril J.M., Lydon L. y Duke S.O. 1992. Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1002(40): 289-293.
- Morgan R.K. 1989. Chemotypic characteristics of *Thymus vulgaris* L. in Central Otago, New Zealand. *Journal of Biogeography* 16: 483-491.
- Nagy J.G. y Tengerdy R.P. 1967. Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. *Applied Microbiology* 15 (4): 819-821.
- Namdeo, A.G., Mahadik K.R. y Kadam S.S. 2006. Anti-malarial drug-*Artemisia annua* *Pharmacognosy Magazine* 2: 973-1296.
- Nilsson M.C. 1994. Separation of allelopathy and resource competition by the boreal dwarf shrub *Empetrum hermaphroditum* Hagerup. *Oecologia* 98: 1-7.
- Norris R.F. y Kogan M. 2005. Ecology of interactions between weeds and arthropods. *Annual Review of Entomology* 50: 479-503.
- Oreja F.H. y González-Andújar J.L. 2007. Modelling competition between large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) and glyphosate-resistant soybean in the Rolling Pampas of Argentina. *Crop Science* 2: 62-67.
- Özgülven M., Sener B., Orhan I., Sekeroglu N., Kirpik M., Kartal M., Pesin I. y Kaya Z. 2008. Effects of varying nitrogen doses on yield, yield components and

- artemisinin content of *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products* 27: 60-64.
- Park S.E., Benjamin L.R., Watkinson A.R. 2003. The theory and application of plant competition models: an agronomic perspective. *Annals of Botany* 92: 741-748.
- Perry, L.G., Thelen G., Ridenour W., Weir T.L., Callaway R.M., Paschke M.W y Vivanco J.M. 2005. Dual role for an allelochemical: (\pm)-catechin from *Centaurea maculosa* root exudates regulates conspecific seedling establishment. *Journal of Ecology* 93:1126-1135.
- Perticari A., Arias N., Baigorri H., De Battista J., Lett L., Montecchia M., Pacheco Basurco J., Simonella A., Toresani S., Ventimiglia L. y Vicentini R. 2003. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. Capítulo 7. Pp. 69-76 en Satorre E. (ed.) *El libro de la soja*. Ed. SEMA, Buenos Aires.
- Pimentel D., Lach L., Zuniga R. y Morison D. 2000. Environmental and economic costs associated with non-indigenous species in the United States. *BioScience* 50: 53-65.
- Popa V.I., Dumutru M., Volf I. y Anghel N. 2008. Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Industrial Crops and Products* 27(2): 144-149.
- Porwal M.K. y Gupta O.P. 1986. Allepathic influence of winter weeds on germination and growth of wheat. *Journal of Tropical Agriculture* 4: 276-279.
- Putnam A.R. y Weston L.A. 1986. Adverse impacts of allelopathy in agricultural systems. Pp. 43-52 en Putnam A.R. y Tang C.S. (eds.) *The Science of Allelopathy*. Wiley, New York.
- Qian G.P., Yang Y.W. y Ren Q.L. 2005. Determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. reversed phase HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 28: 705-712.
- Qian Z.H., Gong K., Zhang L., Lv Jb, Jing F.Y., Wang Y.Y., Guan S.B., Wang G.F. y Tang K.K. 2007. A simple and efficient procedure to enhance artemisinin content in *Artemisia annua* L. by seeding to salinity stress. *African Journal of Biotechnology* 6:1410-1413.
- Qureshi M.I., Israr M., Abdin M.Z. e Iqbal M. 2005. Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 53: 185-193.
- Radosevich S.R., Holt J. y Ghera C.M. 1997. *Weed Ecology. Implications for management*. 2° ed. J. Wiley y Sons, Inc., New York.
- Radosevich S.R., Stubbs y Ghera C.M. 2003. Plant invasions. Process and patterns. *Weed Science* 51: 254-259.
- Radosevich S.R., Holt J. y Ghera C.M. 2007. Capítulo 1. Weeds and Invasive Plants. En: *Ecology of Weeds and Invasive Plants: Relationship to Agriculture and Natural Resource Management*. 3° ed. Wiley- Interscience, Hoboken, NJ.
- Rai R., Pandey S. y Rai S.P. 2011. Arsenic-induced changes in morphological, physiological, and biochemical attributes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, an antimalarial plant. *Ecotoxicology* 20(8):1900-1913.
- Reddy K.N. 2000. Effect of glyphosate on growth, chlorophyll content and nodulation in glyphosate-resistant soybeans (*Glycine max*) varieties. *Journal of New Seeds* 2: 37-52.
- Reigosa, MJ. Pedrol, N. Sánchez-Moreiras y González, L. 2002. Stress and allelopathy. Pp. 231-256 en Reigosa, MJ. y Pedrol, N. (eds.) *Allelopathy from molecules to ecosystems*, Science Publisher Inc. Enfield, NH.
- Rice E.L. 1974. *Allelopathy*. Academic Press. New York.

- Rice E.L. y Pancholy S.K. 1974. Inhibition of nitrification by climax ecosystems III. Inhibitors other than tannins. *American Journal of Botany* 61: 1095-110.
- Rice E.L. 1979. *Allelopathy*. New York, Orlando, Academic Press.
- Rice E.L., Lin C.Y. y Huang C.Y. 1981. Effects of decomposing rice straw on growth and nitrogen fixation by *Rhizobium*. *Journal of Chemical Ecology* 7: 333-344.
- Rice E.L. 1984. *Allelopathy*. Orlando, Florida, Academic Press 2^oed.
- Rice E.L. 1987. Allelopathy: An overview. Allelochemical: Role in agriculture in forestry. ACS Symp. Ser. 330. pp.8-22.
- Ridenour W.M. y Callaway R.M. 2001. The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass. *Oecologia* 126: 444-450.
- Rifflé M.S., Waller G.R., Murray D.S. y Sgaramello R.P. 1990. Devil's-claw (*Proboscidea lousianica*), Essential oil and its components. Potential allelochemicals agents on cotton and wheat. *Journal of Chemical Ecology* 16: 1927-1940.
- Rizvi S.J.V. y Rizvi V. 1992. A discipline called allelopathy. Pp. 1-8 en Rizvi S.J.V. y Rizvi V. (eds.) *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*. Chapman and Hall, London.
- Romagni J.G., Allen S.N. y Dayan F.E. 2000. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology* 26: 303-313.
- Romeo, J. y Weidenhamer J. 1998. Bioassays for Allelopathy in Terrestrial Plants. Pp. 179-211 en Haynes K.F. y Millar J.G. (eds.). *Methods of Chemical Ecology*, Volumen 2: Bioassay Methods. Kluwer Academic Publishers, Norvell, MA.
- Romeo J.T. 2000. Raising the beam: moving beyond phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2011-2014.
- Ryan M.R., Smith R.G., Mortensen D.A., Teasdale J.R., Curran W.S., Seidel R. y Shumways D.L. 2009. Weed crop competition relationships differ between organic and conventional cropping systems. *Weed Research* 49: 572-580.
- Salisbury F.B. y Ross C.W. 1992. *Fisiología vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana, México.
- Salgueiro L., Vila R., Tomas X., Tomi F., Cañigüeral S., Casanova J., Proença Da Cunha A. y Adzet T. 1995. Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochemistry* 38: 391-396.
- Salvagiotti F., Cassman K.G., Specht J.E., Walters D.T., Weiss A., y Dobermann A. 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research* 105: 1-14.
- San Emeterio L., Damgaard C. y Canals R.M. 2007. Modelling the combined effect of chemical interference and resource competition on the individual growth of two herbaceous populations. *Plant and Soil* 292: 95-103.
- Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F. y Sangwan R.S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3-21.
- Santos A. y Flores M. 1995. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 20:349-352.
- SAS Institute Inc. 2005. Base SAS 9.1 Procedures Guide. Cary, NC: SAS Institute, Inc.
- Schwinghamer E.A., Evans H.J. y Dawson M.D. 1970. Evaluation of effectiveness in mutant strains of *Rhizobium* by acetylene reduction relative to other criteria for N₂ fixation. *Plant and Soil* 33: 192-212.
- Seigler D.S. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy Journal* 88: 876-885.

- Seigler D.S. 2006. Basic pathways for the origin of allelopathic compounds. Pp. 11-62 en: Reigosa M., Pedrol N. y González L. (eds.) *Allelopathy: A physiological process with ecological implications*. Springer, Netherlands.
- Setzer W., Vogler B., Schmidt J., Leahy J. y Rives R. 2004. Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. *Phytotherapy Research* 75: 192-200.
- Shuhua X., Tanner M., N'Goran E.K., Utzinger, J., Chollet J., Bergquist R., Minggang C. y Jiang, Z. 2002. Recent investigations of arteether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica mansoni and haematobia. *Acta Tropica* 82: 175-181.
- Sinden J., Jones R., Hester S., Odom D., Kalisch C., James R. y Cacho O. 2005. The economic impacts of weeds in Australia. CRC for Australian *Weed Management. Technical Series*, vol. 8, Adelaide.
- Singh A., Kaul V.K., Mahajan V.P., Singh A., Misra L.N., Thakur R.S. y Husain A. 1988. Introduction of *Artemisia annua* in India and isolation of artemisinin, a promising antimalarial drug. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* 48: 137-138.
- Singh H.P., Batish D.R. y Kohli R.K. 2001. Allelopathy in agroecosystems: an overview. Pp. 1-41 en Kohli R.K., Singh H.P. y Batish D.R. (eds.) *Allelopathy in Agroecosystems*. The Haworth Press, New York.
- Singh A., Singh D. y Singh N.B. 2009. Allelochemical stress produced by aqueous leachate of *Nicotiana glauca* Viv. *Plant Growth Regulation* 58: 163-171.
- Sinkkonen A. 2001. Density-dependent chemical interference-an extension of the biological response model. *Journal of Chemical Ecology* 27: 1513-1523.
- Smith J., Tucker D., Watson K. y Jones G. 2007. Identification of antibacterial constituents from the indigenous Australian medicinal plant *Eremophila duttonii* F. Muell. (Myoporaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 112: 386-93.
- Snaydon R.W. 1991. Replacement or additive designs for competition studies? *Journal of Applied Ecology* 28: 930-946.
- Sodaeizadeh H., Rafieiolhossaini M. y Van Damme P. 2010. Herbicidal activity of a medicinal plant, *Peganum harmala* L., and decomposition dynamics of its phytotoxins in the soil. *Industrial Crops and Products* 31: 385-394.
- Sodek L. y Silva D. M. 1996. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8(3):187-191.
- Soria M.A., Pagliero F.E., Correa O.S., Kerber N.L. y Garcia A.F. 2006. Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* E109 to osmotic stress and the stability of liquid inoculants depend on growth phase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 1235-1241.
- Staman K., Blum U., Louws F. y Robertson D. 2001. Can simultaneous inhibition of seedling growth and stimulation of rhizosphere bacterial population provide evidence for phytotoxin transfer from plant residues in the bulk soil to the rhizosphere of sensitive species? *Journal of Chemical Ecology* 27(4): 807-829.
- StatSoft Inc. 2004. STATISTICA (Data Analysis Software System), version 7. www.statsoft.com.
- Stiles L.H., Leather G.R. y Chen P.K. 1994. Effects of two sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua* on physiology of *Lemna minor* L. *Journal of Chemical Ecology* 20: 969-978.
- Swift M.J. y Anderson J.M. 1993. Biodiversity and ecosystem function in agricultural systems. Pp. 15-41 en Schluzer y Mooney H.A. (eds.) *Biodiversity and ecosystem function*. Springer-Verlag, New York.

- Tang C.S, Cai W.F, Kohl K. y Nishimoto R.K. 1995. Plant stress and allelopathy. Pp. 142-157 en Inderjit, Dakshini K.M.M.y Einhelling F.A. (eds.) *Allelopathy: organisms, processes and applications*. ACS Symposium Series 582, American Chemical Society, Washington, D.C.
- ter Braak C.J.F. 1987. The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* 69: 69-77.
- Tétényi P. 1986. Chemotaxonomic aspects of essential oils. Pp. 11-32 en Craker L.E. y Simon J.E. (eds.) *Herbs, Species and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology*. Phoenix, AZ, The Oryx Press.
- Thijs H., Shann J.R. y Weidenhamer J.D. 1994. The effects of phytotoxins on competitive outcome in a model system. *Ecology* 75(7): 1959-1964.
- Toniutti M., Astegiano E. y Fornasero L. 2004 Respuesta al cultivo de soja a la inoculación con *Bradyrhizobium* en lotes de alta productividad en la región central de Santa Fe. Revista Técnica AAPRESID, Octubre 2004.
- Tsvetkova G.E. y Georgiev G.I. 2003. Effect of phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum*-soybean (*Glycine max* L. Merr) symbiosis. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* Special Issue 331-335.
- Tzenkova R., Kamenarska Z., Draganov A. y Atanasov A. 2010 Composition of *Artemisia annua* essential oil obtained from species growing wild in Bulgaria. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 24(2): 1833-1835.
- USDA. 1999. Keys of Soil Taxonomy, 8th ed. Pocahontas.Press, Blacksburg, VA.
- Vaughn S.F. 1995. Phytotoxic and antimicrobial activity of 5,7-Dihydroxychromone from peanut shells. *Journal of Chemical Ecology* 21(2): 107-115.
- Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Oxford, Reino Unido.
- Vila-Aiub M.M. y Ghersa C.M. 2005. Building up resistance by recurrently exposing target plants to sublethal doses of herbicide. *European Journal of Agronomy* 22:195-207.
- Verdian-rizi M.R., Sadat-Ebrahimi E., Hadjiakhoondi A., Fazeli M.R. y Pirali Hamedani M. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia annua* L. essential oil from Iran. *Journal of Medicinal Plants* 7(4): 58-62.
- Verdian-rizi M.R. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. from Iran. *Pharmacognosy Research* 1: 21-24.
- Verma R.K., Chauhan A., Verma R.S. y Gupta A.K. 2011. Influence of planting date on growth, artemisinin yield, seed and oil yield of *Artemisia annua* L. under temperature climatic conditions. *Industrial Crops and Products* 34: 860-864.
- Veteli T.O., Mattson W.J., Niemelä P., Julkunen-Tiitto R., Kellomäki S., Kuokkanen K. y Lavola A. 2007. Do elevated temperature and CO₂ generally have counteracting effects on phenolic phytochemistry of boreal trees? *Journal of Chemical Ecology* 33: 287-296.
- Vokou D., Margaris N.S. y Lynch J.M. 1984. Effects of volatile oils from aromatic shrubs on soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 509-513.
- Vokou D., Chalkos D. y Karamanoli K. 2006. Capítulo 15. Microorganisms and allelopathy: a one-sided approach. Pp. 341-371 en Reigosa M.P., Pedrol N. y González L. (eds.) *Allelopathy: a Physiological Process with Ecological Implications*. Springer, Netherlands.
- Waller G.R. y Einhellig F.A. 1999. Overview of allelopathy in agriculture, forestry and ecology. Pp. 221-245 en Chou C.H., Waller G.R. y Reinhart C. (eds.) *Biodiversity*

- and Allelopathy: from organisms to ecosystems in the Pacific. Academia Sinica. Taipei.
- Wardle D.A., Nicholson K.S. y Ahmed M. 1992. Comparison of osmotic and allelopathic effects of grass leaf extracts on grass seed germination and radicle elongation. *Plant and Soil* 140: 315-319.
- Wardle D.A., Yeates G.W., Watson R.N. y Nicholson K.S. 1993. Response of soil microbial biomass and plant litter decomposition to weed management strategies in maize and asparagus cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 857-868.
- Wardle D.A., Nicholson K.S., Ahmed K.S. y Rahman A. 1994. Interference effects of the invasive plant *Carduus nutans* L. against the nitrogen fixation ability of *Trifolium repens* L. *Plant and Soil* 163: 287-297.
- Wardle D.A., Nilsson M.C., Gallet C. y Zackrisson O. 1998. An ecosystem-level perspective of allelopathy. *Biological Review* 73: 305-319.
- Waring R.H. y Pitman G.B. 1985. Modifying lodgepole pine stands to change susceptibility to mountain pine beetles. *Ecology* 66: 889-897.
- Waterman P.G. 1993. The chemistry of volatile oils. Pp. 47-61 en Hay, R.K.M. y Waterman, P.G. (eds.) *Volatile oil crops: Their Biology Biochemistry and Production*. Longman Scientific and Technical, Reino Unido.
- Weaver M.A., Krutz L.J., Zablotowicz R.M. y Reddy K.N. 2007. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Management Science* 63: 388-393.
- Weidenhamer J., Hartnett D. y Romeo J. 1989. Density-dependent phytotoxicity: Distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. *Journal of Applied Ecology* 26(2): 613-624.
- Weidenhamer J. 1996. Distinguishing resource competition and chemical interference: over coming the methodological impasse. *Agronomy Journal* 88: 866-875.
- Weidenhamer J. 2006. Distinguishing allelopathy from resource competition: The role of density. Pp. 85-103 en Reigosa M., Pedrol N. y González L. (eds.) *Allelopathy: A physiological process with ecological implications*. Springer, Netherlands.
- Weidenhamer J.D. 2008. Allelopathic mechanisms and experimental methodology. Pp. 119-135 en Zeng R. S., Mallik A. U. y Luo S. M. (eds.) *Allelopathy in sustainable agriculture and forestry*. New York, Springer Science and Business Media.
- Weidenhamer J.D. y Callaway R.M. 2010. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. *Journal of Chemical Ecology* 36: 59-69.
- Weston L.A. y Putnam A.R. 1985. Inhibition of growth, nodulation and nitrogen fixation of legumes by quackgrass. *Crop Science* 25: 561-565.
- Weston L.A. y Putnam A.R. 1986. Inhibition of legume seedling growth by residues and extracts of quackgrass (*Agropyron repens*). *Weed Science* 34 (3): 366-372.
- Weston L.A. 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal* 88: 860-866.
- Weston L.A. y Duke S.O. 2003. Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 22(3y4): 367-389.
- Whittaker R.H. y Feeney P.P. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* 171: 757-770.
- Wiley/NIST. 2008. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 8°ed. J. Wiley and Sons, Inc., New York/NIST/EPA/NIH (2005) Mass Spectral Library, vers. 2.0.
- Williamson G.B. y Weidenhamer J.D. 1990. Bacterial degradation of juglone: Evidence against allelopathy? *Journal of Chemical Ecology* 16:1739-1742.

- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- Wurst S. y Van Beersum S. 2009. The impact of soil organism composition and activated carbon on grass-legume competition. *Plant Soil* 314: 1-9.
- Wurst S., Vender V. y Rilling M. 2010. Testing for allelopathic effects in plant competition: does activated carbon disrupt plant symbioses? *Plant Ecology* 211 (1): 19-26.
- Yulin L., Qingtao M., Xueyong Z. y Jianyuan C. 2008. Relationship between fresh leaf traits and leaf litter decomposition of 20 plant species in Kerqin sandy land, China. *Acta Ecologica Sinica* 28(6): 2486-2492.
- Zablotowicz R.M. y Reddy K.N. 2004. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. *Journal of Environmental Quality* 33: 825-831.
- Zimdahl R.C. 2007. *Fundamentals of Weed Science*. Academic Press. San Diego, California. 2° ed.

ANEXO

Cuadro Anexo 2.1 Determinaciones químicas del suelo correspondiente a un Argiudol vértico (de acuerdo a la taxonomía del USDA, 1999)

Prof.	pH 1:2,5	CT	NT	P	NH ₄	NO ₃	N-NO ₃
cm	H ₂ O	W. Black	Kjeldhal	B y K	KCL	CuSO ₄	
		g/Kg	g/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	Kg ha ⁻¹
0-20	6,55	19,29	1,67	86,10	28	118,15	72,17
20-40	7,10	12,73	1,90	39,50	7	72,7	46,05

Prof.	C.E.(e.s.)	CIC	Ca 2+	Mg 2+	Na +	K+	S (SO ₄ ⁻²)
cm	dS/ m	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	mg/Kg
0-20	0,46	25,60	17,30	3,00	0,24	2,40	12
20-40	0,50	24,60	17,80	2,10	0,06	2,10	11

Anexo 2.2 Confirmación del efecto del herbicida

No se encontraron diferencias significativas atribuidas a la presencia o no del carbón activado ($p=0,22$). El nivel de clorofila en hoja varió según el tratamiento de herbicida y densidad ($p<0,001$). El índice de clorofila en las plantas de altamisa para los diferentes niveles de densidad ($D2$, $D3$, $D4$ y $D5$) expuestas a herbicida ($H+$), fue consistentemente menor que el tratamiento $H-$. En cambio en las plantas de soja ($D1$), no se encontraron diferencias significativas en esta variable. Estos resultados ponen de manifiesto que las plantas de altamisa expuestas al herbicida, estuvieron bajo condiciones de estrés, no así para el caso de la soja (Fig. 2.2).

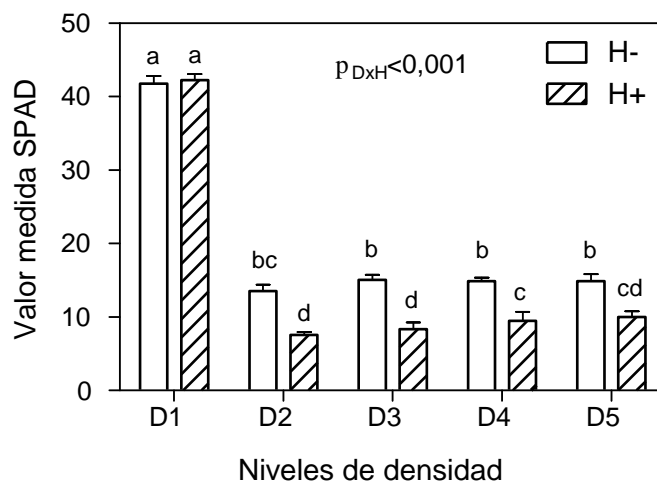


Figura Anexo 2.1 Valor del índice de clorofila en hoja (SPAD) según los niveles de densidad D, (soja/altamisa, plantas m^{-2}); $D1$, 40/0 plantas m^{-2} ; $D2$, 40/2 plantas m^{-2} ; $D3$, 40/4 plantas m^{-2} ; $D4$, 40/8 plantas m^{-2} , y $D5$, 0/8 plantas m^{-2} , en la etapa vegetativa V5 de soja (Fehr y Caviness, 1977).

Anexo 2.3 Efecto del carbón activado en la monoculturas *D1* y *D5* a floración y a madurez de soja

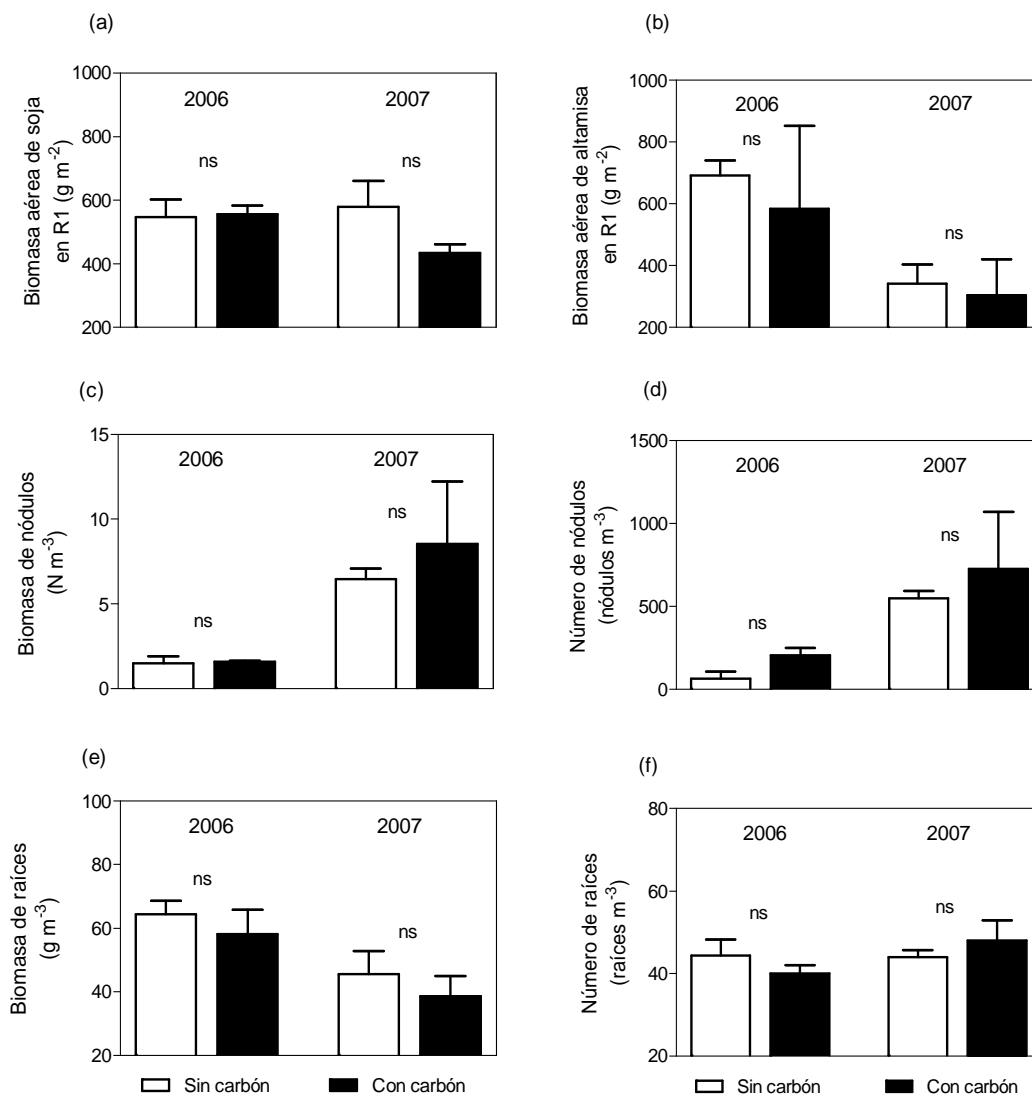


Figura Anexo 2.2 Efecto del carbón activado en las parcelas *D1* y *D5* a floración de soja (R1, Ferh y Caviness, 1977) sobre: (a) biomasa de soja (g m^{-2}), (b) biomasa de altamisa (g m^{-2}), (c) biomasa de nódulos (g m^{-3}), (d) número de nódulos (nódulos m^{-3}), (e) biomasa de raíces de soja (g m^{-3}), y (f) número de raíces de soja (raíces m^{-3}) en las parcelas control durante el 2006 y 2007. Las parcelas control fueron soja pura (*D1*) o altamisa pura (*D5*) sin carbón y sin herbicida (barras blancas) y con carbón y sin herbicida (barras negras), respectivamente. Las medias de biomasa de altamisa, número y biomasa de nódulos fueron re-transformadas (aplicando anti-logaritmo). Las líneas verticales denotan el error estándar de la media. ns, no significativo al nivel $p < 0,05$ del F-test.

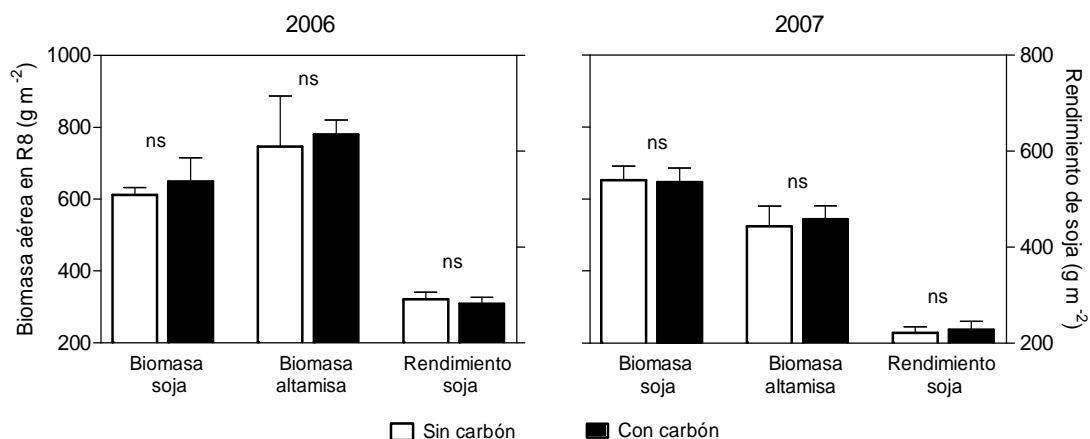


Figura Anexo 2.3 Efecto del carbón activado en las parcelas *D1* y *D5* a madurez de soja (R8, Ferh y Caviness, 1977) sobre: la biomasa de soja y altamisa (g m⁻²) y el rendimiento de soja (g m⁻²) en las parcelas control durante el año 2006 y 2007. Las parcelas control fueron soja pura (*D1*) o altamisa pura (*D5*) sin carbón y sin herbicida (barras blancas) y con carbón y sin herbicida (barras negras), respectivamente. Las medias de biomasa de altamisa fueron re-transformadas. Las líneas verticales denotan el error estándar de la media. ns, no significativo al nivel $p < 0,05$ del F-test.

Cuadro Anexo 3.1 a Valores medios \pm error estándar de los compuestos (%) del aceite esencial de *Artemisia annua* en el 2006.

2006	%								
Compuestos/Trat.	D2 H-		D4 H-		D5 H-		D4 H+	D5H+	
alfa-tuyeno	0,05	(0,05)	0,00	(0,00)	0,03	(0,03)	0,10	0,00	(0,00)
alfa-pineno	1,35	(0,25)	1,05	(0,05)	1,23	(0,06)	1,00	0,75	(0,25)
canfeno	2,45	(0,25)	2,30	(0,30)	2,53	(0,20)	2,10	1,75	(0,45)
1-octen-3-ol	0,60	(0,20)	0,40	(0,40)	0,56	(0,03)	0,70	0,40	(0,20)
sabineno	0,40	(0,10)	0,85	(0,55)	0,26	(0,08)	0,30	0,15	(0,05)
mirceno	0,45	(0,15)	0,95	(0,75)	0,20	(0,00)	0,10	0,10	(0,00)
beta-pineno	0,35	(0,15)	1,40	(1,00)	0,43	(0,06)	1,10	0,50	(0,20)
para-cimeno	2,50	(1,10)	1,20	(0,70)	0,86	(0,12)	0,70	0,65	(0,15)
limoneno	0,20	(0,00)	0,05	(0,05)	0,06	(0,03)	0,20	0,00	(0,00)
1,8-cineol	5,30	(1,30)	10,90	(2,70)	4,26	(0,26)	5,90	3,55	(0,45)
gamma-terpineno	0,05	(0,05)	0,05	(0,05)	0,00	(0,00)	0,10	0,00	(0,00)
cis-sabineno hidrato	0,95	(0,05)	1,40	(0,20)	1,00	(0,00)	1,00	0,95	(0,15)
epoxi-mirceno	0,05	(0,05)	0,05	(0,05)	0,00	(0,00)	0,00	0,00	(0,00)
desconocido 12,6	1,75	(0,75)	1,50	(0,40)	0,76	(0,03)	0,50	0,40	(0,10)
trans-sabineno hidrato	0,95	(0,05)	1,05	(0,15)	0,76	(0,28)	1,00	1,05	(0,25)
alfa-canfolenal	0,00	(0,00)	0,10	(0,10)	0,06	(0,06)	0,40	0,25	(0,25)
crisantenona	0,20	(0,10)	0,35	(0,15)	0,43	(0,24)	1,00	0,50	(0,20)
trans pinocarveol	1,50	(0,60)	1,55	(0,55)	1,13	(0,48)	0,30	0,40	(0,30)
alcanfor	40,55	(1,45)	40,40	(1,40)	45,63	(1,12)	40,00	39,25	(13,75)
pinocarvona	0,25	(0,05)	0,75	(0,55)	0,56	(0,08)	0,70	0,45	(0,25)
borneol	1,00	(0,10)	0,75	(0,35)	0,80	(0,15)	2,40	1,10	(0,40)
terpinen-4-ol	0,70	(0,00)	0,80	(0,30)	0,83	(0,03)	0,90	0,80	(0,10)
alfa-terpineol	0,40	(0,20)	0,75	(0,45)	0,26	(0,03)	0,30	0,25	(0,05)
mircenol	0,00	(0,00)	0,45	(0,45)	0,30	(0,00)	0,40	0,40	(0,40)
trans carveol	0,50	(0,20)	0,10	(0,10)	0,40	(0,00)	0,40	0,30	(0,30)
carvona	0,20	(0,00)	0,15	(0,15)	0,23	(0,03)	0,30	0,10	(0,10)
alfa-copaeno	0,25	(0,05)	0,20	(0,20)	0,30	(0,00)	0,30	0,10	(0,10)
isobutil fenil acetato	0,30	(0,10)	0,10	(0,10)	0,20	(0,00)	0,30	0,15	(0,15)
beta cariofileno	3,55	(0,25)	3,55	(1,05)	3,86	(0,08)	5,10	1,80	(1,50)
trans beta-farneseno	2,75	(0,45)	3,80	(0,70)	4,03	(0,23)	2,50	2,25	(1,25)
alfa-humuleno	0,20	(0,00)	0,10	(0,10)	0,33	(0,03)	0,30	0,20	(0,00)
desconocido tr 26,9	2,90	(0,60)	1,45	(0,25)	0,90	(0,35)	1,60	3,85	(2,95)
germacreno D	4,30	(0,30)	5,70	(0,60)	3,46	(0,59)	4,00	1,20	(0,90)
beta-selineno	0,90	(0,20)	0,55	(0,05)	0,56	(0,03)	0,70	0,95	(0,35)
biciclogermacreno	0,35	(0,05)	0,65	(0,25)	0,23	(0,06)	0,20	0,30	(0,20)
no ident 30,61	1,60	(0,20)	0,70	(0,10)	1,40	(0,05)	0,80	1,30	(0,70)
espatulenol	0,80	(0,10)	0,95	(0,25)	0,59	(0,11)	0,90	0,90	(0,40)
oxido de cariofileno	1,00	(0,10)	0,90	(0,50)	2,600	(0,25)	2,50	1,70	(0,60)
no ident 33,1	1,90	(0,60)	1,30	(0,40)	1,70	(0,11)	2,00	3,80	(0,80)
cis-cadin-4-en-7-ol	1,20	(0,00)	0,55	(0,05)	0,63	(0,03)	1,20	2,30	(1,30)
no ident 33,3	3,00	(1,00)	1,95	(0,95)	2,43	(0,06)	2,70	5,30	(1,40)
1,7-diepi-alfa-cedrenal	1,80	(0,30)	0,85	(0,15)	1,10	(0,06)	1,10	2,65	(1,05)
afa-bisabolol	0,70	(0,10)	0,50	(0,20)	0,43	(0,03)	0,40	0,60	(0,20)
germacra-trien-1-alfa-ol*	0,35	(0,05)	0,30	(0,20)	0,36	(0,07)	0,20	0,60	(0,20)
no ident 43,0	0,60	(0,00)	0,65	(0,25)	0,88	(0,20)	0,70	1,80	(0,40)

*germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alfa-ol

Trat.: tratamientos

Cuadro Anexo 3.1 b Valores medios \pm error estándar de compuestos (%) del aceite esencial de *Artemisia annua* en el 2007.

2007	%										
Compuestos/ Trat.	D2 H-		D4 H-		D5 H-		D2 H	D4 H+		D5 H+	
alfa-tuyeno	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)	0,05	(0,02)	0,10	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
alfa-pineno	1,25	(0,25)	1,05	(0,25)	0,55	(0,25)	0,40	0,10	(0,10)	0,50	(0,10)
canfeno	2,20	(0,40)	2,60	(0,80)	1,33	(0,53)	2,70	0,50	(0,20)	1,65	(0,25)
1-octen-3-ol	0,25	(0,05)	0,35	(0,05)	0,13	(0,07)	0,00	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
sabineno	0,30	(0,10)	0,40	(0,10)	0,65	(0,06)	0,30	0,10	(0,10)	0,40	(0,00)
mirceno	1,55	(0,55)	1,60	(0,10)	0,60	(0,34)	0,50	0,00	(0,00)	0,15	(0,15)
beta-pineno	1,65	(0,55)	0,20	(0,10)	0,35	(0,17)	0,90	0,30	(0,10)	0,75	(0,45)
para-cimeno	1,35	(0,35)	1,45	(0,15)	0,73	(0,10)	0,30	0,10	(0,10)	0,70	(0,10)
limoneno	0,20	(0,10)	0,05	(0,05)	0,05	(0,05)	0,00	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
1,8-cineol	4,40	(0,40)	7,05	(1,85)	6,03	(1,64)	3,90	1,55	(0,25)	6,30	(1,80)
gamma-terpineno	0,15	(0,05)	0,15	(0,15)	0,05	(0,05)	0,00	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
cis-sabineno hidrato	0,30	(0,00)	0,55	(0,25)	0,50	(0,12)	0,10	0,35	(0,15)	0,55	(0,35)
epoxi-mirceno	0,10	(0,10)	0,00	(0,00)	0,05	(0,05)	0,00	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
desconocido 12,6	1,80	(0,10)	0,40	(0,40)	1,38	(0,49)	0,20	0,40	(0,40)	1,42	(1,08)
trans-sabineno hidrato	0,50	(0,10)	0,50	(0,20)	0,48	(0,04)	0,10	0,20	(0,20)	0,45	(0,25)
alfa-canfolenal	0,10	(0,10)	0,70	(0,10)	0,25	(0,18)	0,00	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
crisantenona	0,45	(0,15)	0,45	(0,35)	0,25	(0,16)	0,70	1,10	(0,70)	0,40	(0,10)
trans pinocarveol	1,80	(0,20)	1,55	(0,35)	1,08	(0,67)	0,00	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
alcanfor	46,70	(1,60)	37,65	(2,45)	33,45	(5,10)	51,50	33,10	(11,00)	49,45	(8,05)
pinocarvona	0,70	(0,10)	0,25	(0,05)	0,33	(0,06)	0,40	0,35	(0,05)	0,60	(0,30)
borneol	0,90	(0,00)	2,25	(0,05)	2,88	(1,07)	1,50	3,50	(0,90)	3,15	(0,25)
terpinen-4-ol	1,35	(0,05)	1,25	(0,35)	0,78	(0,18)	0,50	0,50	(0,00)	0,50	(0,00)
alfa-terpineol	0,50	(0,00)	0,50	(0,10)	0,45	(0,06)	0,40	0,25	(0,05)	0,30	(0,10)
mircenol	0,20	(0,20)	0,00	(0,00)	0,33	(0,13)	0,70	0,95	(0,45)	0,70	(0,50)
trans carveol	0,80	(0,00)	0,50	(0,00)	0,38	(0,10)	0,20	0,25	(0,25)	0,05	(0,05)
carvona	0,35	(0,15)	0,10	(0,10)	0,10	(0,05)	0,20	0,00	(0,00)	0,05	(0,05)
alfa-copaeno	0,20	(0,10)	0,05	(0,05)	0,20	(0,00)	0,00	0,00	(0,00)	0,15	(0,05)
isobutil fenil acetato	0,30	(0,00)	0,25	(0,25)	0,13	(0,07)	0,00	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
beta cariofileno	1,85	(0,05)	2,60	(0,00)	4,08	(0,88)	1,30	2,16	(0,65)	3,30	(1,00)
trans beta-farneseno	1,35	(0,15)	2,75	(0,55)	4,10	(0,45)	1,40	2,05	(0,45)	3,65	(0,95)
alfa-humuleno	0,35	(0,25)	0,30	(0,30)	0,35	(0,08)	0,00	0,00	(0,00)	0,05	(0,05)
desconocido tr 26,9	2,10	(0,10)	2,45	(0,25)	1,55	(0,32)	3,00	1,68	(0,43)	0,85	(0,55)
germacreno D	2,50	(0,00)	4,65	(1,25)	5,30	(0,48)	1,90	1,65	(0,15)	3,25	(1,85)
beta-selineno	0,40	(0,00)	0,60	(0,00)	0,73	(0,10)	0,40	0,20	(0,20)	0,35	(0,15)
biciclogermacreno	0,20	(0,00)	0,40	(0,10)	0,33	(0,07)	0,10	0,05	(0,05)	0,15	(0,15)
no ident 30,61	1,35	(0,15)	1,40	(0,20)	1,50	(0,60)	1,10	1,50	(0,50)	0,95	(0,55)
espatulenol	0,60	(0,20)	1,00	(0,00)	1,03	(0,16)	0,70	2,95	(0,55)	1,00	(0,20)
oxido de cariofileno	0,85	(0,15)	1,05	(0,35)	1,58	(0,23)	0,60	3,65	(0,15)	1,75	(0,15)
no ident 33,1	0,85	(0,45)	1,60	(0,10)	2,40	(0,76)	1,10	3,65	(1,15)	1,10	(0,80)
cis-cadin-4-en-7-ol	0,90	(0,20)	0,75	(0,15)	1,35	(0,53)	0,00	0,75	(0,25)	0,00	(0,00)
no ident 33,3	1,40	(0,30)	2,45	(0,45)	3,13	(0,72)	1,50	3,45	(0,65)	1,80	(1,20)
1,7-diepi-alfa-cedrenal	1,50	(0,40)	1,35	(0,25)	0,48	(0,29)	0,00	0,00	(0,00)	0,00	(0,00)
afa-bisabolol	2,80	(0,70)	1,85	(1,25)	0,63	(0,26)	0,60	8,05	(8,05)	0,45	(0,35)
germacra-trien-1-alfa-ol*	0,45	(0,25)	0,50	(0,10)	0,40	(0,30)	0,00	0,00	(0,00)	0,05	(0,05)
no ident 43.0	0,95	(0,35)	0,85	(0,15)	0,75	(0,45)	2,00	1,45	(0,35)	0,30	(0,10)

*germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alfa-ol
 Trat.: tratamientos

Cuadro Anexo 3.2 Scores de los compuestos del aceite esencial de altamisa indicadores de los tratamientos. Fue considerada la composición del aceite esencial como matriz principal y las características de materia seca y producción y concentración de terpenos, y presencia de herbicida, como matriz secundaria.

	Compuestos	Año	2006		2007	
			Eje 1	Eje 2	Eje 1	Eje 2
1	alfa-tuyeno		1,847	-0,399	-1,074	-0,930
2	alfa-pineno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
3	canfeno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
4	1-octen-3-ol		-0,074	-0,100	0,349	0,043
5	sabineno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
6	mirceno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
7	beta-pineno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
8	para-cimeno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
9	limoneno		1,511	1,018	-0,107	0,284
10	1,8-cineol		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
11	gamma-terpineno		1,768	0,571	-0,048	1,371
12	cis-sabineno hidrato		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
13	epoxi-mirceno		1,797	-0,613	2,967	-0,136
14	desconocido 12,6		-0,074	-0,100	-0,066	0,007
15	trans-sabineno hidrato		-0,074	-0,100	0,064	0,494
16	alfa-canfolenal		-0,755	0,944	0,671	-0,440
17	crisantenona		-0,074	-0,100	-0,146	0,163
18	trans pinocarveol		-0,074	-0,100	1,398	-0,048
19	alcanfor		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
20	pinocarvona		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
21	borneol		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
22	terpinen-4-ol		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
23	alfa-terpineol		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
24	mircenol		-0,926	1,790	-0,456	-0,555
25	trans carveol		0,173	0,488	-0,096	-0,033
26	carvona		0,173	0,488	0,087	0,965
27	alfa-copaeno		0,685	0,044	0,236	0,226
28	isobutil fenil acetato		0,173	0,488	2,009	-0,693
29	beta cariofileno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
30	trans beta-farneseno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
31	alfa-humuleno		-0,074	-0,100	0,206	-0,583
32	desconocido tr 26,9		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
33	germacreno D		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
34	beta-selineno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
35	biciclogermacreno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
36	no ident 30,61		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
37	espatulenol		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
38	oxido de cariofileno		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
39	no ident 33,1		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
40	cis-cadin-4-en-7-ol		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
41	no ident 33,3		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
42	1,7-diepi-alfa-cedrenal		-0,074	-0,100	1,398	-0,048
43	Alfa-bisabolol*		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033
44	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alfa-ol*		-0,074	-0,100	0,278	0,119
45	no ident 43.0		-0,074	-0,100	-0,096	-0,033

* Nombre resumido en la Fig. 3.7, año 2007

Cuadro Anexo 3.3 Valores medios de artemisinina (% , expresados sobre la base seca de 100 g de biomasa de hojas e inflorescencias)

Año	D	H	n	Artemisinina (%)
2006	D4	H-	2	0,35
	D5	H-	2	0,16
	D5	H+	2	0,43
2007	D4	H+	2	0,44
	D5	H-	2	0,32

Muestras determinadas en el laboratorio Mediplant (Suiza).

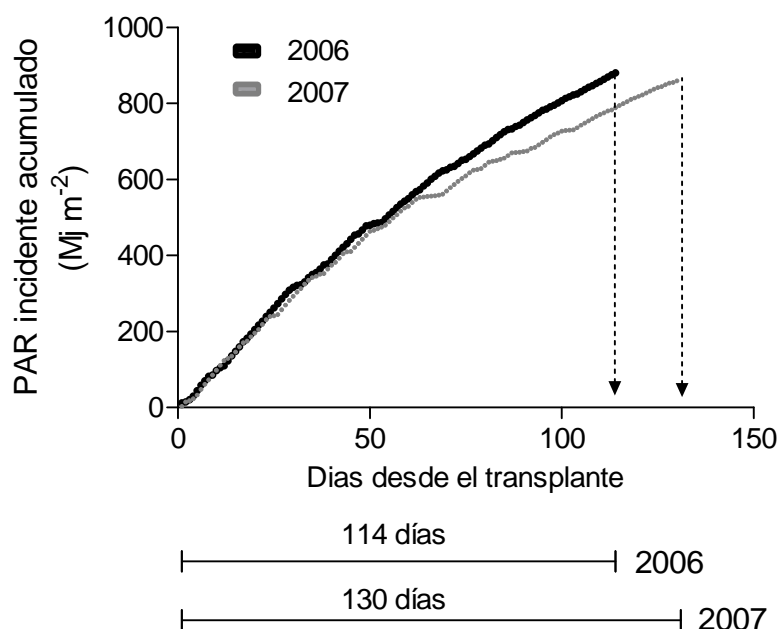


Figura Anexo 3.4 Evolución del PAR incidente (Mj m⁻²) desde el día del transplante de altamisa en las parcelas experimentales de los años 2006 y 2007. Se presenta la duración de la estación de crecimiento de altamisa para ambos experimentos. Las flechas indican momento de cosecha.

Cuadro Anexo 4.1 a Determinaciones químicas de los sustratos utilizados en el experimento (Valores promedio de tres muestras compuestas).

Sustrato	pH 1:2,5 H ₂ O	C.E. (e.s.)	CT W. Black	NT Kjeldhal	P B y K	NH ₄ KCL	NO ₃ CuSO ₄	H ₂ O seco 105 °C	CIC	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	S (SO ₄ ⁻²)
		dS/ m	g/Kg	g/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	%	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	cmolc/Kg	mg/Kg
<i>S_{ARCILLOSO}</i>	6,4	0,65	32	2,77	110,1	7,2	196,9	9,8	28,1	17	3,6	0,4	2,4	15
<i>S_{ARENOSO}</i>	6,5	0,55	7,62	1,36	78,1	5,2	147	3,4	14,4	8,9	2	0,17	1,8	15,5

Cuadro Anexo 4.1 b Contenido de arena, arcillo y limo y clasificación textural según los sustratos utilizados en el experimento.

Sustrato	Contenido ¹ (%)			
	Arena	Arcilla	Limo	Clasificación textural*
<i>S_{ARCILLOSO}</i>	10	35	55	franco arcillo limoso
<i>S_{ARENOSO}</i>	55	17	28	franco arenoso

¹ Información provista por la Cátedra de Edafología.

*USDA Taxonomy, 1999.

Cuadro Anexo 5.1 Composición y proporción del aceite esencial (%) proveniente del tratamiento de la monocultura de altamisa, sin herbicida y sin carbón del experimento del año 2007.

	Compuestos	%
1	alfa-tuyeno	0,1
2	alfa-pineno	0,9
3	canfeno	2,1
4	1-octen-3-ol	0,3
5	sabineno	0,7
6	mirceno	1,2
7	beta-pineno	0,6
8	para-cimeno	0,9
9	limoneno	0,1
10	1,8-cineol	8,8
11	gamma-terpineno	0,1
12	cis-sabineno hidrato	0,7
13	epoxi mirceno	0,1
14	monoterpeno desconocido de PM: 138 (0,0001: 12,6)	2,1
15	trans-sabineno hidrato	0,5
16	alfa-canfolenal	0,5
17	crisantenona	0,5
18	trans pinocarveol	2,2
19	alcanfor	35,7
20	pinocarvona	0,4
21	borneol	1,2
22	terpinen-4-ol	1,1
23	alfa-terpineol	0,5
24	mircenol	0,4
25	trans carveol	0,4
26	carvona	0,1
27	alfa-copaeno	0,2
28	isobutil fenil acetato	0,3
29	beta cariofileno	3,1
30	trans beta-farneseno	3,6
31	alfa-humuleno	0,4
32	sesquiterpeno desconocido de PM: 204 (tr: 26,9)	1,5
33	germacreno D	5,8
34	beta-selineno	0,8
35	biciclogermacreno	0,5
36	sesquiterpeno desconocido de PM: 218 (tr: 30,6)	1,0
37	espatulenol	1,1
38	oxido de cariofileno	1,4
39	sesquiterpeno desconocido de PM: 220 (tr: 33,1)	1,5
40	cis-cadin-4-en-7-ol	0,5
41	sesquiterpeno desconocido de PM: 220 (tr: 33,3)	2,3
42	1,7-diepi-alfa-cedrenal	1,0
43	afa-bisabolol	1,0
44	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-alfa-ol	0,8
45	diterpeno desconocido de PM: 234 (tr: 43,0)	0,8

Figura Anexo 5.1 Fotografía explicativa del experimento cualitativo. Observación del crecimiento de *B. japonicum* a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos control (C) y de artemisinina A1, A2 y A3 (2, 4 y 80 $\mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente).

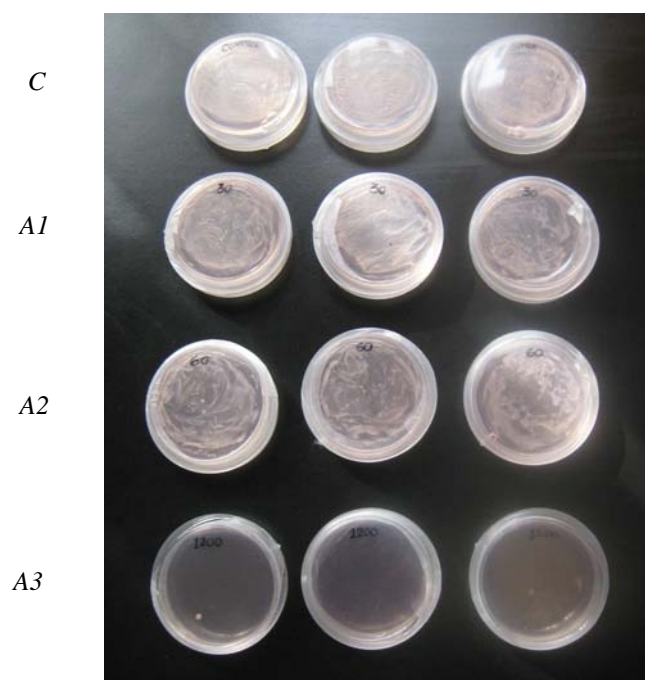


Figura Anexo 5.2 Fotografía explicativa del experimento cualitativo. Observación del crecimiento de *B. japonicum* a los 5 días desde su siembra, según los tratamientos control (C), de aceite esencial E1 y E2 (1,6 y 3,46 $\mu\text{l ml}^{-1}$, respectivamente), y la interacción de artemisinina y esencia A2xE1 (4 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de artemisinina x 1,6 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de esencia).

